

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales



---

**ESTUDIO Y DESARROLLO DE NUEVOS INMUNOSENSORES  
ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCION Y CUANTIFICACION  
DE LA BACTERIA ENTEROTOXICOGENICA *ESCHERICHIA COLI***

---

Tesis presentada por la Ing. Lorena Viviana Tarditto  
para acceder al grado de Doctora en Ciencias Químicas

DIRECTOR: Dr. Héctor Fernández  
CO-DIRECTOR: Dr. Hugo García Ovando

Río Cuarto, 08 de Mayo de 2017

## COMISION ASESORA Y JURADO DE TESIS

### **Dra. Isabel Lucila Barberis**

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

Firma:.....

### **Dr. Juan Miguel Marioli**

Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

Firma:.....

### **Dr. Julio Raba**

Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, San Luis.

Firma:.....

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Universidad Nacional de Río Cuarto

08 de Mayo de 2017

Calificación:

## DIRECTOR Y CO-DIRECTOR

---

.....  
**Dr. Héctor Fernández**

.....  
**Dr. Hugo García Ovando**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron, acompañaron e hicieron posible la concreción de esta tesis, en particular

al Dr. Fabrisio Alustiza, por su generosidad, excelente predisposición y por facilitarme sus conocimientos sobre la cepa *E. coli*

a la Lic. Claudia Basualdo, por enseñarme todos los procedimientos experimentales, indispensables, para comenzar a trabajar en microbiología

al grupo de investigación de la Dra. Lucila Barberis, por su ayuda incondicional desde el inicio de esta tesis

a los Dres. Carlos Errecalde, Guillermo Prieto y Fernando Mañas, por permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio

al grupo de Salud Porcina de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, quienes aportaron las muestras

al personal no docente del Depto. de Patología y del Depto. Clínica Animal, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, por permitirme utilizar sus instalaciones y esterilizar el material

al personal docente y no docente del Depto. de Química, por su gran colaboración en todos estos años

a los Dres. Héctor Fernández, Nelio Vettorazzi, Alicia Zon, Fernando Arévalo y Hugo García Ovando, que me orientaron y formaron durante este recorrido

a los miembros del Jurado, Dra. Lucila Barberis, Dr. Juan Miguel Marioli y Dr. Julio Raba, por su tiempo, dedicación y buena predisposición para la corrección de los informes previos y de esta tesis

a mis padres, quienes siempre me apoyaron y ayudaron en todos mis estudios

a mi familia, Turco y Emi, por su amor, apoyo y motivación

y finalmente a todos aquellos compañeros y amigos que estuvieron presentes estos años y con quienes compartimos hermosos momentos.

## **RECURSOS FINANCIEROS PARA LA REALIZACION DE LA TESIS**

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada con los siguientes proyectos:

- “Electroquímica de sustancias de interés en los sistemas agroalimentarios y de sanidad animal. Desarrollo de biosensores y aplicaciones analíticas”.

Institución otorgante: ANPCYT (FONCYT). 2011-2015. PICT BICENTENARIO N° 2010-0916.

- “Electroquímica de sustancias de interés en los sistemas agroalimentario y de sanidad animal. Desarrollo de biosensores electroquímicos. Aplicaciones analíticas”.

Institución otorgante: MINCyT Córdoba. 2011-2012. PID-2010 N° 000113/2011.

- “Electroquímica de sustancias de interés en los sistemas agroalimentarios y de sanidad animal. Desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos y aplicaciones analíticas”.

Institución otorgante: ANPCYT (FONCYT). 2016-2019. Res. Dir. 270/15. PICT N° 2014-2266.

- “Estudios electroquímicos de sustancias de interés en los sistemas agroalimentarios y de sanidad animal. Desarrollo de bioelectrodos y sus aplicaciones analíticas”.

Institución otorgante: CONICET. 2012-2015. Res. N° 1672 (06/06/12). PIP N° 112-201101-00184.

- “Electroquímica de sustancias de interés en los sistemas agroalimentarios y de reproducción animal. Inmovilización de biomoléculas sobre electrodos nanoestructurados. Desarrollo de biosensores y aplicaciones analíticas”.

Institución otorgante: SECyT/UNRC. 2012-2015. Res. Rec. Nro. 852/11, 328/12 y 1230/2014.

- “Electroquímica de sustancias de interés en los sistemas agroalimentarios y de sanidad animal. Desarrollo de sensores y biosensores”.

Institución otorgante: SECyT/UNRC. 2016-2018. Res. Rec. Nro. N° 331/16.

## **PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTIFICAS Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS**

L.V. Tarditto, F.J. Arévalo, M.A. Zon, H.G. Ovando, N.R. Vettorazzi, H. Fernández. Electrochemical sensor for the determination of enterotoxigenic *Escherichia coli* in swine feces using glassy carbon electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes, *Microchem. J.*, 127 (2016) 220-225.

W.I. Riberi, L.V. Tarditto, M.A. Zon, F.J. Arévalo, H. Fernández. Development of a very sensitive electrochemical immunosensor to determine zearalenone in maize samples. Enviado para su publicación.

L.V. Tarditto, F.J. Arévalo, M.A. Zon, H.G. Ovando, N.R. Vettorazzi, H. Fernández. Electrochemical magneto immunosensor for the determination of enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 (K88) in swine feces by square-wave voltammetry. Enviado para su publicación.

Lorena Viviana Tarditto, Fernando Javier Arévalo, María Alicia Zon, Hugo García Ovando, Héctor Fernández. Desarrollo de un sensor electroquímico para la detección de *Escherichia coli* F4 (K88) empleando electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono. VII Congreso Argentino de Química Analítica. Mendoza, Argentina, 2013.

Tarditto, L.V., Arévalo, F.J., Vettorazzi, N.R., García Ovando, H., Fernández, H. Detección electroquímica de *Escherichia coli* enterotoxigénica en muestras de materia fecal porcina. VIII Congreso Argentino de Química Analítica, La Plata, Argentina, 2015.

Tarditto, L.V; Arévalo, F.J.; Vettorazzi, N.R.; García Ovando, H; Fernández, H. Desarrollo de un magneto-inmunosensor electroquímico para la detección de *Escherichia coli* F4 (K88) (ETEC). VIII Congreso Argentino de Química Analítica, La Plata, Argentina, 2015.

## INDICE

Indice de Tablas.....	vii
Indice de Figuras .....	vii
Resumen .....	xi
Abstract.....	xii
Abreviaturas.....	xiv
 CAPITULO 1. INTRODUCCION .....	1
1.1. Enfermedades intestinales en porcinos. Generalidades .....	1
1.2. Diarrea neonatal (DNN) y diarrea postdestete (DPD) por <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) enterotoxigénica.....	3
1.3. <i>E. coli</i> en porcinos .....	5
1.4. <i>E. coli</i> enterotoxigénica F4 (K88) (ETEC F4).....	7
1.5. Diagnóstico de DNN y DPD causada por ETEC F4 .....	9
Referencias .....	14
 HIPOTESIS .....	21
OBJETIVOS.....	21
Objetivos generales.....	21
Objetivos específicos .....	21
 CAPITULO 2. CONCEPTOS Y FUNDAMENTOS TEORICOS .....	23
2.1. Sensores y biosensores electroquímicos .....	23
2.2. Sensores bioelectroquímicos.....	24
2.2.1. Interacción microorganismo-electrodo .....	26
2.2.2. Nanotubos de carbono.....	27
2.3. Biosensores electroquímicos - generalidades .....	29
2.3.1. Inmunosensores electroquímicos (IEs) .....	30
2.3.2. Anticuerpos .....	33
2.3.3. Inmovilización de anticuerpos sobre transductores electroquímicos.....	34
2.3.4. Partículas magnéticas en IEs.....	36
Referencias .....	38
 CAPITULO 3. FUNDAMENTOS Y TECNICAS ELECTROQUIMICAS .....	44
3.1. Introducción .....	44
3.2. Sistemas electroquímicos.....	45
3.2.1. Celdas electroquímicas.....	45
3.2.2 Electroodos de trabajo.....	47
3.3. Técnicas electroquímicas .....	49
3.3.1. Voltamperometría cíclica .....	49
3.3.2. Voltamperometría de onda cuadrada .....	50
Referencias .....	53
 CAPITULO 4. SENSOR BIOELECTROANALITICO .....	55
4.1. Consideraciones generales .....	55
4.2. Materiales y reactivos .....	55
4.3. Metodología .....	60
4.3.1. Preparación de stock de cultivo de ETEC F4 .....	60

4.3.2. Preparación de suspensiones de ETEC F4 .....	61
4.3.3. Determinación de la concentración de suspensiones de ETEC F4 .....	62
4.3.4. Preparación de muestras de materia fecal .....	67
4.3.5. Modificación de electrodos de trabajo .....	69
4.4 Resultados y Discusión .....	70
4.4.1. Comportamiento electroquímico de suspensiones de bacterias vivas.....	70
4.4.2. Respuesta electroquímica de suspensiones de bacterias sometidas a lisis celular .	76
4.4.3. Determinaciones electroquímicas en muestras de materia fecal porcina.....	79
4.4.4. Método de adiciones estándar en muestras de materia fecal porcina.....	84
4.5. Conclusiones .....	85
Referencias .....	86
 CAPITULO 5. MAGNETO-INMUNOSENSOR ELECTROQUIMICO .....	90
5.1. Consideraciones generales .....	90
5.2. Materiales y reactivos .....	92
5.3. Metodología .....	96
5.3.1. Suspensiones de ETEC F4 .....	96
5.3.2. Optimización de condiciones para la detección de ETEC F4 .....	97
5.3.3. Optimización del magneto-inmunosensor .....	98
5.4. Resultados y discusión.....	100
5.4.1. Análisis del comportamiento electroquímico del p-aminofenol y del p-aminofenil $\beta$ -g-galactopiranosido .....	100
5.4.2. Optimización de condiciones para la detección de ETEC F4 .....	102
5.4.3. Optimización del magneto-inmunosensor .....	107
5.4.4. Curva de calibrado .....	109
5.4.5. Determinaciones en muestras.....	111
5.4.6. Validación del magneto-inmunosensor.....	112
5.5. Conclusiones .....	114
Referencias .....	116
 CAPITULO 6. CONCLUSIONES GENERALES.....	118

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
2.1 Criterios de clasificación de los biosensores	29
4.1 Preparación e interpretación de la escala Mc Farland	64
4.2 Respuestas electroquímicas de suspensiones ETEC F4 con electrodos de CV desnudo y modificados	70
4.3 Valores de $I_{p,n}$ y $E_p$ obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de suspensiones de bacterias vivas de ETEC F4	75
4.4 $I_{p,n}$ y $E_p$ en función del tiempo de sonicado de suspensiones de ETEC F4	77
4.5 Resultados de distintos procedimientos de preparación de muestras de materia fecal porcina	80
4.6 Valores de $I_{p,n}$ y $E_p$ observados en voltamperogramas de onda cuadrada de muestras de materia fecal porcina de animales de distintas edades	81

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
2.1 Inmunosensores tipo sándwich y competitivo	31
2.2 Estructura de un anticuerpo	34
3.1 Esquema de celda electroquímica de tres electrodos	46
3.2 Programa de potencial en el tiempo que se aplica al electrodo de trabajo en voltamperometría cíclica	50
3.3 Perturbación de potencial en el tiempo que se aplica al electrodo de trabajo en voltamperometría de onda cuadrada	51
4.1 Colonias aisladas de ETEC F4 sobre agar tripteína soja	56
4.2 Colonias aisladas de ETEC F4 sobre agar eosina azul de metileno	56
4.3 Colonias aisladas de ETEC F4 sobre agar Mac Conkey	57
4.4 Procedimiento de preparación de suspensiones de ETEC F4	62



4.5	Determinación de células viables mediante recuento en placa	63
4.6	DO de los estándares de Mc Farland	65
4.7	Aproximación lineal entre los valores de DO y el número de UFC mL <sup>-1</sup>	65
4.8	Correlación entre DO y el conteo en placa de suspensiones de ETEC F4	66
4.9	Relación entre la escala de Mc Farland y conteo en placa	67
4.10	Voltamperogramas cíclicos en SAFS de electrodos a) carbono vítreo (CV) desnudo, b) CV modificado con NTCPM dispersos en agua y nafión y c) CV modificado con NTCPM dispersos en agua.	69
4.11	Voltamperogramas cíclicos de suspensiones de ETEC con electrodo de CV desnudo y modificados con NTCPM	70
4.12	Voltamperogramas cíclicos consecutivos de suspensiones de ETEC F4	71
4.13	Variación de la $I_{p,n}$ en función de la frecuencia (f) y $f^{1/2}$ con electrodos CV/NTCPM	72
4.14	Variación de la $I_{p,n}$ en función de la frecuencia (f) y $f^{1/2}$ con electrodos CV/NTCPM-Nafión	73
4.15	Voltamperogramas de onda cuadrada de suspensión de ETEC F4 a distintos tiempos de preconcentración: a) 0; b) 2 min; c) 4 min, d) 8 min y e) 16 min	73
4.16	Voltamperogramas de onda cuadrada de a) suspensión de ETEC F4 y b) en ausencia de bacterias	74
4.17	A) Curva de crecimiento de ETEC F4. $t_{inc}$ : tiempo de incubación. B) Corrientes netas obtenidas de suspensiones de ETEC F4 en a) Fase estacionaria y b) Fase exponencial	74
4.18	Voltamperogramas de suspensiones de ETEC F4 en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis	75
4.19	Curva de calibrado de suspensiones de bacterias vivas ETEC F4	76
4.20	Voltamperogramas de onda cuadrada de suspensiones de ETEC F4, luego de distintos tiempos de tratamiento con ultrasonido: a) 10 min, b) 20 min y c) 30 min	77
4.21	a) Corriente neta de suspensiones inactivadas de ETEC F4, b) Curva de calibrado de suspensiones ETEC F4	78
4.22	Voltamperogramas de onda cuadrada de una muestra de materia fecal porcina bajo distintos procedimientos de preparación: a)	80

Homogeneización mediante vórtex, b) 10 min de centrifugado a 500 rpm, c) 5 min de centrifugado a 1000 rpm y d) 10 min de centrifugado a 1000 rpm

4.23	Voltamperogramas de onda cuadrada de muestras de materia fecal porcina de animales de distintas edades: 1) 4 semanas, 2) 16 semanas, 3) 19 semanas, 4) 22 semanas A y 5) 22 semanas B	81
4.24	Voltamperogramas de onda cuadrada de suspensión de ETEC F4 en SAFS	82
4.25	Voltamperogramas de onda cuadrada de distintas diluciones de materia fecal porcina en SAFS: 1) 1/5, 2) 1/50, 3) 1/500 y 4) 1/5000	82
4.26	Voltamperogramas de onda cuadrada de muestra de materia fecal porcina: 1) diluida 1/5 en SAFS y 2) muestra diluida 1/5 con el agregado de suspensión de ETEC F4 a una concentración $4,20 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup>	83
4.27	Voltamperogramas de muestra de materia fecal porcina: 1) diluida 1/5000 en SAFS y 2) muestra diluida 1/5000 con el agregado de suspensiones de ETEC F4 a una concentración $2,00 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup>	84
4.28	Corriente neta de a) muestra de materia fecal porcina diluida 1/5000 en SAFS, b) muestra diluida 1/5000 con el agregado de $2,00 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup> de ETEC F4	84
5.1	a) Reacción de hidrólisis de PAFG catalizada por $\beta$ -gal y producción de PAF; b) Oxidación de PAF a p-iminoquinona	90
5.2	Esquema del procedimiento empleado para la detección de ETEC F4 en base a la actividad de la $\beta$ -gal	91
5.3	Reacciones catalizadas por la enzima $\beta$ -gal	93
5.4	Estructuras de lactosa, alolactosa e IPTG	94
5.5	Estructura de polimixina B	95
5.6	Electrodo de capa impresa de carbono	96
5.7	Procedimiento empleado para optimizar las condiciones de detección de ETEC F4	97
5.8	Esquema del procedimiento empleado para la detección de ETEC F4 empleando el magneto-inmunosensor electroquímico. 1) Preparación de complejos PM-pAb; 2) Preparación de suspensiones de ETEC F4; 3) Formación de complejos PM-pAb-ETEC F4 y detección	99
5.9	Respuesta electroquímica de una solución $10^{-4}$ M de PAF utilizando un ECIC mediante a) VC a $100 \text{ mV s}^{-1}$ y b) VOC a una frecuencia de 25 Hz	100

5.10	Voltamperogramas de onda cuadrada consecutivos de PAFG a distintos tiempos desde el agregado del sustrato a la superficie del ECIC: 1) 1 min, 2) 3 min, 3) 5 min y 4) 10 min	101
5.11	Optimización del tiempo de reacción entre el sustrato PAFG (0,33 mg mL <sup>-1</sup> ) y la enzima $\beta$ -gal	103
5.12	Optimización del tiempo de permeabilización con sulfato de polimixina B (10 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	104
5.13	Optimización del tiempo de incubación con IPTG de concentración 0,5 mM	105
5.14	Optimización de la concentración de IPTG	106
5.15	Optimización de la concentración de PAFG	106
5.16	Optimización de la concentración de SPM	107
5.17	Optimización de la concentración de pAb	108
5.18	Optimización del volumen de PM	109
5.19	Voltamperogramas de onda cuadrada utilizando el magneto-inmunosensor electroquímico de suspensiones ETEC F4 en SAFS: B) inmunoensayo sin ETEC F4, 1) 10 <sup>1</sup> , 2) 10 <sup>2</sup> , 3) 10 <sup>3</sup> , 4) 10 <sup>4</sup> , 5) 10 <sup>5</sup> y 6) 10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	110
5.20	Curva de calibrado de suspensiones ETEC F4 utilizando el magneto-inmunosensor electroquímico	110
5.21	Voltamperogramas de onda cuadrada de suspensiones de ETEC F4 1,6 x10 <sup>3</sup> UFC mL <sup>-1</sup> en 1) SAFS; 2) muestra de materia fecal porcina (dilución 1/10 y centrifugado); 3) muestra inactivada (dilución 1/10, centrifugado e inactivación)	112

## RESUMEN

En la especie porcina, *Escherichia coli* enterotoxigénica F4 (K88) (ETEC F4) es uno de los principales agentes etiológicos involucrados en las diarreas neonatal (DNN) y postdestete (DPD), que generan importantes pérdidas económicas debido a sus altas tasas de mortalidad y morbilidad.

En la presente Tesis Doctoral, se desarrollaron un sensor bioelectroanalítico y un magneto-inmunosensor electroquímico para la detección y cuantificación de ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina de manera simple, rápida y económica.

El sensor bioelectroanalítico consistió en un electrodo de carbono vítreo modificado con una dispersión de nanotubos de carbono de pared múltiple, en solución acuosa conteniendo 1 % de nafión. La respuesta electroquímica de suspensiones de ETEC F4 por voltamperometría de onda cuadrada (VOC) consistió en un pico de oxidación irreversible a un potencial cercano a 0,67 V vs Ag/AgCl. A fin de optimizar las condiciones para la detección, se analizaron los posibles mecanismos mediante los cuales se produce la transferencia directa de electrones entre la bacteria y el electrodo. Se utilizaron suspensiones de bacterias vivas y también inactivadas por autoclave, preparadas en solución amortiguadora de fosfatos salinos (SAFS). Los mejores resultados en cuanto a sensibilidad e intervalo lineal se obtuvieron con suspensiones de bacterias inactivadas en autoclave. Las muestras de materia fecal porcina consistieron en una dilución 1/5000 (g materia fecal /  $\mu\text{L}$  SAFS), centrifugada en condiciones leves (10 min a 500 rpm) y la posterior inactivación del sobrenadante en autoclave. Se realizaron agregados sucesivos de suspensiones ETEC F4 al sobrenadante de las muestras y se observó la respuesta electroquímica con concentraciones de ETEC F4 comprendidas en el intervalo de  $2,00 \times 10^3 - 2,00 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ . El límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y la desviación relativa estándar fueron  $6 \times 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$  y 20 %, respectivamente.

Por otra parte, para el magnetoinmunosensor electroquímico se utilizaron electrodos de capa impresa de carbono (ECIC) y partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-ETEC F4. La detección se basó en la actividad de la enzima intracelular  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), la cual hidroliza el sustrato p-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (PAFG) generando el p-aminofenol (PAF). El PAF se oxida sobre la superficie del ECIC y se detectó por VOC. Se utilizaron suspensiones de bacterias que fueron previamente

incubadas con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), para favorecer la producción de  $\beta$ -gal. Para el inmunoensayo, se agregaron partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-ETEC F4 (PM-pAb) a las suspensiones de bacterias. Luego de una incubación y pasos de lavado, los complejos PM-pAb-ETEC F4 se resuspendieron en solución de permeabilizador sulfato de polimixina B ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y sustrato PAFG ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), se colocaron sobre el ECIC y se realizó la detección por VOC. Se optimizaron las variables relacionadas con el principio de detección (tiempo de incubación con IPTG, tiempo de permeabilización, tiempo de reacción con PAFG y las concentraciones de estos reactivos) y las variables del inmunosensor (concentración de anticuerpo y volumen de partículas magnéticas). Se realizó una curva de calibrado en el intervalo de concentraciones  $10^1 - 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ . El intervalo lineal estuvo comprendido entre  $1 \times 10^1$  y  $4 \times 10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$ , el LD fue  $33 \text{ UFC mL}^{-1}$  y la sensibilidad fue  $4 \times 10^2 \mu\text{A mL UFC}^{-1}$ . Las muestras de materia fecal se prepararon diluyendo 1 g en 10 mL de SAFS y se centrifugaron 10 min a 500 rpm. Se realizaron determinaciones en el sobrenadante y sobrenadante inactivado, a los cuales se les agregaron bacterias ETEC F4 del orden de  $10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$ . El magneto-inmunosensor fue validado frente a la técnica convencional de cultivo y recuento en placas.

## ABSTRACT

In pigs, enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 (K88) (ETEC F4) is one of the main etiological agents involved in neonatal diarrhea (DNN) and postdestete diarrhea (DPD), which generate significant economic losses due to their high mortality and morbidity.

In this Doctoral Thesis, a bioelectroanalytical sensor and an electrochemical magneto-immunosensor were developed for the detection and quantification of ETEC F4 in stool samples of pigs in a simple, fast and economical way.

The bioelectroanalytic sensor was a glassy carbon electrode modified with a dispersion of multi-walled carbon nanotubes plus 1% Nafion<sup>TM</sup>. The electrochemical response of ETEC F4 suspension by square wave voltammetry (SWV) consisted of an irreversible oxidation peak at a potential close to  $0.67 \text{ V vs Ag / AgCl}$ . In order to optimize the conditions for detection, the possible mechanisms through which the direct transfer of electrons between the bacteria and the electrode is produced, were analyzed. Suspensions of live bacteria and also inactivated by autoclave, prepared in phosphate buffer saline

(PBS) were used. The best results in terms of sensitivity and linear range were obtained with suspensions of inactivated bacteria. Porcine faecal samples consisted of a dilution of 1/5000 (g stool sample /  $\mu\text{L}$  PBS), centrifuged under mild conditions (10 min at 500 rpm) and subsequent inactivation of the supernatant in autoclave. Successive additions of ETEC F4 suspensions were made to the supernatant of the samples. The electrochemical response was observed with ETEC F4 concentrations in the range of  $2.00 \times 10^3$  -  $2.00 \times 10^7$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . The limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ) and the relative standard deviation were  $6 \times 10^4$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ,  $2 \times 10^5$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  and 20%, respectively.

On the other hand, an electrochemical magneto-immunosensor was developed using carbon screen printed electrodes (CSPE) and magnetic particles conjugated with anti-ETEC F4 antibodies. Detection was based on the activity of the intracellular  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) enzyme, which hydrolyzes the p-aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (PAPG) substrate to generate p-aminophenol (PAP). The PAP oxidizes on the surface of the CSPE and is detected by SWV. Bacterial suspensions were incubated with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to promote  $\beta$ -gal production. For the immunoassay, magnetic beads were added with anti-ETEC F4 antibodies (MB-pAb) to the bacterial suspensions. After incubation and washing steps, the MB-pAb-ETEC F4 complexes were resuspended in solution of polymyxin B sulfate ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and PAPG substrate ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), placed on CSPE and detection was performed. The variables related to the detection principle (incubation time with IPTG, permeabilization time, reaction time with PAPG and the concentrations of these reagents) and the immunosensor variables (antibody concentration and volume of magnetic particles) were optimized. A calibration plot was performed in the  $10^1$  -  $10^7$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  concentration range. The linear interval was between  $1 \times 10^1$  and  $4 \times 10^4$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ , the LOD was 33 CFU  $\text{mL}^{-1}$  and the sensitivity was  $4 \times 10^2 \mu\text{A mL CFU}^{-1}$ . Stool samples were prepared by diluting 1 g in 10 ml PBS and centrifuged 10 min at 500 rpm. Determinations were made in the supernatant and inactivated supernatant, in which  $10^3$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  of ETEC F4 bacteria were added. The magneto-immunosensor was validated with the conventional technique of culture and plate count.

## ABREVIATURAS

Agar Eosina Azul de Metileno	EMB
Agar Tripteína Soja	ATS
Antígeno	Ag
Antígeno marcado con una enzima	Ag*
Anticuerpo de captura	Ab
Anticuerpo marcado con una enzima	Ab*
Anticuerpo policlonal anti-ETEC F4	pAb
$\beta$ -galactosidasa	$\beta$ -gal
Caldo Tripteína Soja	CTS
Carbono vítreo desnudo	CV
CV modificado con NTCPM dispersos en agua	CV/NTCPM
CV modificado con NTCPM dispersos en agua-Nafión	CV/NTCPM-Nafión
Contraelectrodo	CE
Corriente neta	$I_n$
Corriente de pico neta	$I_{p,n}$
Densidad óptica	DO
Diarrea neonatal	DNN
Diarrea postdestete	DPD
Electrodos de capa impresa de carbono	ECIC
Electrodo de trabajo	ET
Electrodo de referencia	ER
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	ETEC
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica F4 (K88)	ETEC F4
Especies	<i>spp.</i>
Inmunoglobulinas	Ig
Inmunosensores electroquímicos	IEs
Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido	IPTG
Límite de Cuantificación	LC
Límite de Detección	LD
Nanotubos de carbon	NTC

Nanotubos de carbono de pared múltiple	NTCPM
Nanotubos de carbono de pared simple	NTCPS
p-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido	PAFG
p-aminofenol	PAF
Partículas magnéticas	PM
Partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-ETEC F4	PM-pAb
Polimixina B	PMB
Reacción en Cadena de la Polimerasa	PCR
Real Time PCR	RT-PCR
Solución amortiguadora de fosfatos 0,05 M pH 6	SAF
Solución amortiguadora de fosfatos salina 10 mM pH 7	SAFS
Sulfato de polimixina B	SPM
Tiempo de reacción	$t_r$
Tiempo de permeabilización	$t_p$
Toxinas termolábiles	LT
Toxinas termoestables	ST
Unidades formadoras de colonias por mililitro	UFC mL <sup>-1</sup>
Voltamperometría Cíclica	VC
Voltamperometría de Onda Cuadrada	VOC



### Capítulo 1. INTRODUCCION

#### 1.1. Enfermedades intestinales en porcinos. Generalidades

Desde el momento de su nacimiento hasta la adultez, los cerdos pueden verse afectados por diversas infecciones entéricas. Cuando esto ocurre, los costos de producción pueden incrementarse debido a las tasas de mortalidad, aumento de los costos de alimentación, costos laborales y tratamientos veterinarios, medidas preventivas por el mayor riesgo de incidencia de otras enfermedades, disminución en el rendimiento productivo debido al retardo en la ganancia de peso de los animales, etc [1]. Debido a que las enfermedades gastrointestinales son muy frecuentes en los establecimientos de producción porcina, éstas influyen significativamente sobre su rentabilidad productiva.

En la actualidad, el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad, los factores de riesgo, los signos clínicos y los estudios epidemiológicos de las enfermedades porcinas de origen bacteriano más frecuentes, permitieron establecer pautas con la finalidad de realizar un diagnóstico presuntivo diferencial [2]. De esta manera, ante la aparición de los primeros síntomas que permitan elaborar un cuadro clínico, se inician rápidamente terapias antimicrobianas para controlar las infecciones.

Además de la utilización de agentes antimicrobianos de manera terapéutica en los establecimientos porcinos, es frecuente su empleo como medida profiláctica y metafiláctica [3]. Sin embargo, esto puede generar modificaciones en la composición de la microbiota digestiva y el incremento de fenómenos de resistencia antimicrobiana, con importantes consecuencias en medicina veterinaria y en salud pública. Así, hasta el año 2006, los antibióticos fueron utilizados como promotores de crecimiento [4,5] y se administraban como suplementos alimentarios para disminuir la aparición de infecciones entéricas. Posteriormente, fueron eliminados de la dieta de los cerdos debido al riesgo de incrementar la resistencia de cepas bacterianas patógenas [6] y la posible contaminación residual de la cadena alimentaria [7].

Esta situación condujo a la adopción de otras medidas complementarias para prevenir y controlar las principales enfermedades gastroentéricas del ganado porcino. Estas medidas se relacionan con el manejo del sistema productivo, protocolos de limpieza y desinfección, modificaciones en la dieta de los animales en base a prebióticos y probióticos, entre otras.

Las enfermedades gastrointestinales que afectan comúnmente a los cerdos son causadas por diversos patógenos. Entre ellos, bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Clostridium perfringens* tipo C, *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridium difficile*, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* y especies (*spp*) del género *Salmonella* [8]. También algunos parásitos (*Cryptosporidium spp.*, *Isospora sui*) y virus (*Coronavirus*, *Circovirus porcino* tipo 2) pueden dar inicio ó agravar una situación de enfermedad. La edad en que suelen presentarse las infecciones causadas por estos patógenos es variable, pero todas ellas tienen como principal signo clínico diarrea y deshidratación, y en algunos casos muerte súbita.

Las cepas *E. coli* pueden causar un amplio rango de enfermedades en los cerdos. Estas infecciones incluyen la diarrea neonatal (DNN) y diarrea postdestete (DPD), también conocida como colibacilosis entérica postdestete, enfermedad de los edemas, septicemia, poliserositis, mastitis coliforme e infecciones del tracto urinario [2].

Las DNN y DPD generan importantes pérdidas económicas en todo el mundo debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad [9-11] y son causadas por cepas enterotoxigénicas de la especie *E. coli* (ETEC), aunque también en la DPD pueden estar presentes otras cepas no enterotoxigénicas de *E. coli* [12].

La DNN producida por ETEC se observa comúnmente en cerdos de 0 – 4 días de edad, ya que las infecciones con ETEC pueden ocurrir dentro de las 2 - 24 horas posteriores al nacimiento de los lechones y los signos clínicos se manifiestan rápidamente. La muerte de los animales se produce luego de 12 -24 h del comienzo de la diarrea, debido a la gran deshidratación. Se estima que la mortalidad ocasionada por la DNN por ETEC varía desde el 5 % al 70 % por camada afectada. En una proporción menor de cerdos neonatos la infección puede ser tan rápida que la muerte ocurra antes de la aparición de la diarrea [13]. La morbilidad en una camada de lechones afectados con DNN es extremadamente variable. El promedio es entre el 30-40 %, aunque también puede llegar al 80 % en algunas camadas.

A su vez, la DPD debido a las infecciones con ETEC generalmente se observa durante la primera semana luego del destete. Las pérdidas económicas se atribuyen a la mortalidad, que generalmente es del 1,5 - 2 % de los cerdos y logra alcanzar al 25 % si no se realiza un tratamiento adecuado[14]. Sin embargo, las pérdidas económicas también son muy significativas en el período postdestete debido a las altas tasas de morbilidad, la disminución en la ganancia de peso, los costos de los tratamientos, vacunas y suplementos alimentarios.

### 1.2. Diarrea neonatal (DNN) y diarrea postdestete (DPD) por *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigénica

Las diarreas neonatales en la especie porcina pueden ser ocasionadas por diversos agentes, entre ellos ETEC, *Clostridium perfringens* tipo C, *Clostridium difficile*, *Rotavirus*, *Coronavirus* y *Cryptosporidium spp* [13]. Los signos clínicos y las consecuencias ocasionadas en cerdos lactantes dependerán del agente infeccioso involucrado como también de la susceptibilidad de los cerdos a la infección. Sin embargo, en todos los casos, la aparición de diarrea aguda en cerdos neonatos produce una pérdida rápida y abundante de agua, electrolitos y nutrientes que puede derivar en la muerte del animal en un corto tiempo [1].

Los lechones neonatos presentan una alta vulnerabilidad a diversas infecciones, pero especialmente a las infecciones por *E. coli* ya que esta bacteria se elimina en grandes cantidades por las heces, siendo así muy frecuente su presencia en las granjas porcinas.

En los cerdos neonatos, los factores que proveen una defensa contra las infecciones (una microbiota intestinal estable, integridad del epitelio intestinal, rápida regeneración de las células epiteliales) y que influyen sobre las funciones de barrera intestinal, están menos desarrolladas en comparación con los animales adultos [15]. Su tracto intestinal es un ambiente estéril que, a las pocas horas de nacer, es colonizado rápidamente por diversas bacterias provenientes de la madre (piel, glándulas mamarias o heces) [16] o del ambiente. Así, en condiciones de falta de higiene en las salas de maternidad, se incrementa el riesgo de brotes de colibacilosis debido a infecciones por cepas *E. coli* patógenas.

La severidad de las colibacilosis neonatales depende del título del anticuerpo en la leche materna [17], ya que contiene factores bactericidas no específicos y anticuerpos específicos que inhiben la adherencia de las *E. coli* patógenas al intestino de los lechones. Sin embargo, si la cerda no ha sido vacunada o expuesta a la *E. coli* presente en el ambiente de los cerdos, en el calostro no estarán presentes los anticuerpos específicos y los cerdos serán susceptibles a la infección. Lo mismo ocurre cuando los cerdos no tienen acceso al calostro (debido a incapacidad para competir con otros lechones o a insuficientes glándulas mamarias para el número de lechones). Otros factores como las bajas temperaturas en las salas de parto también impactan sobre la severidad de la enfermedad. En cerdos que están a temperaturas menores a 25 °C, se reduce la actividad peristáltica y lentifica el pasaje de las bacterias y anticuerpos protectores a través del intestino. A su vez,

temperaturas altas favorecen el crecimiento del número de *E. coli* patógenas en el tracto intestinal del cerdo resultando en diarreas más severas que en cerdos que se mantienen a 30 °C [2].

Como puede verse, además de la susceptibilidad morfológica y fisiológica de los cerdos neonatos, otros factores influyen sobre la aparición de estas infecciones como el manejo del sistema productivo, la densidad en las explotaciones porcinas y las condiciones higiénico-sanitarias.

En el ambiente del cerdo, las cepas ETEC pueden sobrevivir al menos seis meses si están “protegidas” por el estiércol [18] y se diseminan rápidamente a través del alimento, otros cerdos u otras especies animales. Así, en presencia de condiciones ambientales apropiadas y factores del huésped, las bacterias ETEC ingresan al animal por vía oral y, cuando se encuentran en cantidades suficientes, colonizan el intestino y proliferan rápidamente hasta alcanzar números del orden de  $10^9$  bacterias por gramo de intestino. Luego, estas producen enterotoxinas que estimulan la secreción de agua y electrolitos al lumen intestinal, generando diarreas acuosas si el exceso de fluidos del intestino delgado no es absorbido en el intestino grueso. Esto puede conducir a la deshidratación, acidosis metabólica y muerte. En algunos casos, como ya se mencionó, la infección puede avanzar tan rápidamente que ocurre la muerte antes de la aparición de diarreas [19].

Los animales recientemente destetados son otro de los principales grupos de riesgo que pueden ser afectados por enfermedades entéricas. La DPD puede ser causada por bacterias como ETEC, *Salmonella spp.* y miembros del género *Clostridium*, *Lawsonia* y *Brachyspira* [20]. La colibacilosis producida por ETEC es la más común y extendida de todas las enfermedades bacterianas que afectan a los cerdos en el período inmediato al destete. Generalmente, son endémicas en muchas granjas y su prevalencia varía con el tiempo.

En el cuerpo del animal recientemente destetado ocurren cambios morfológicos y fisiológicos que pueden favorecer la aparición de DPD. Factores como el estrés del destete, la pérdida de los anticuerpos otorgados por la leche materna, la edad a la cual los animales son destetados, la capacidad de absorción de fluidos en el intestino, la respuesta del sistema inmune, cambios en la dieta y factores del entorno (superpoblación, temperatura del establecimiento y calidad del agua de bebida) contribuyen a la severidad de esta enfermedad multifactorial [21,22].

Con respecto a los virus, los que se diagnostican más frecuentemente son *Rotavirus* y *Coronavirus* [23-25]. Sin embargo, no son la principal causa de diarrea en este

período. En general, cuando afectan a los animales pueden predisponerlos a la infección bacteriana ó agravar las enfermedades [20].

Los cerdos en etapa postdestete pueden infectarse por vía oral en las jaulas de parto previamente contaminadas o mediante el contacto con otros cerdos, alimentos y agua. Las enfermedades por *E. coli* son altamente contagiosas. Una vez infectados, los animales pueden transportar a la bacteria, a veces de manera asintomática, a las distintas unidades del establecimiento productivo [2].

La patogénesis de la DPD es similar a la DNN. Luego de ingerir un número suficiente de cepas ETEC, éstas proliferan en el intestino del cerdo hasta alcanzar concentraciones del orden de  $10^9$  bacterias por gramo de intestino. Seguido a la etapa de colonización del intestino, las cepas ETEC producen las enterotoxinas que inducen la diarrea.

Generalmente, la diarrea desarrollada en el período postdestete es menos severa que la diarrea neonatal, aunque puede durar hasta una semana generando deshidratación y emaciación. Si la infección no es controlada correctamente, luego de varios días la mayoría de los cerdos en un grupo pueden ser afectados y la mortalidad superar el 25 % [2].

### 1.3. *E. coli* en porcinos

Las bacterias de la especie *E. coli* se clasifican dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual también incluye los géneros *Salmonella*, *Proteous* y *Enterobacter*. Las bacterias entéricas pueden caracterizarse fenotípicamente como bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y oxidasa negativa. Sus requerimientos nutricionales son relativamente simples, por lo cual crecen fácilmente en diversos medios de cultivo y fermentan azúcares con diversos productos finales [26].

La mayor parte de las bacterias de la especie *E. coli* son comensales y forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal de los mamíferos. Estas bacterias son unas de las primeras bacterias anaerobias facultativas que colonizan el intestino de los lechones y luego permanecen como parte de la flora normal durante toda la vida del animal. La concentración de *E. coli* es relativamente baja en la parte superior del intestino delgado y se va incrementando hasta alcanzar una concentración máxima en la parte final del intestino grueso, aunque *E. coli* constituye menos del 1 % del conteo total de bacterias intestinales [2].

Diversos factores pueden afectar la composición intestinal de cepas *E. coli* en los cerdos, tales como el destete, la dieta o la edad de los animales [27]. Así, la población de estas bacterias es muy diversa y dinámica y las cepas dominantes pueden cambiar en intervalos de un día a varias semanas [28].

Fuera del intestino, *E. coli* puede encontrarse en concentraciones de  $10^7$  - $10^9$  bacterias por gramo en heces [19] y, en consecuencia, en alimentos, agua y sitios de la granja en general donde haya contaminación fecal.

También existen cepas patógenas, dentro de la especie *E. coli*, que producen una amplia variedad de enfermedades intestinales y extraintestinales en el cerdo. El esquema de patogénesis que emplean generalmente las *E. coli* consiste en varios pasos que incluyen la colonización de un sitio de la mucosa intestinal, evasión de las defensas, multiplicación o replicación y daño en el huésped [29].

Las cepas patógenas se pueden clasificar en patotipos, en base a sus factores de virulencia y los mecanismos por los cuales producen la enfermedad. En la especie porcina, los patotipos más importantes son *E. coli* enterotoxigénica, que se asocia a la DNN y DPD, *E. coli* enteropatogénica, vinculada también a la DPD, *E. coli* productora de toxina Shiga, la cual incluye *E. coli* de la enfermedad de los edemas, *E. coli* enterohemorrágica, y *E. coli* patogénica extraintestinal, asociada a la colisepticemia, poliserositosis e infecciones urogenitales [2].

Los patotipos de *E. coli* pueden ser caracterizados por serotipificación. Este método se basa en las diferencias de los antígenos O (antígenos somáticos, capa de lipopolisacáridos), antígenos K (polisacárido capsular), antígenos H (proteína flagelar) y antígenos F (fimbrial). Así, dentro de la especie *E. coli* pueden definirse serogrupos, basada sólo en los antígenos O, y serotipos, en base a los antígenos O, H y algunas veces, K o F [30].

La serotipificación se utilizó para distinguir las *E. coli* patógenas de las no patógenas y también para estudios epidemiológicos, observándose cierta asociación entre los serotipos y ciertos factores de virulencia.

Actualmente, en el esquema de tipificación internacional se reconocen 174 antígenos O (O1 – O181, aunque los grupos O 31, 47, 67, 72, 93, 94 y 122 han sido eliminados) y 53 antígenos H (H1 – H56, con antígenos 13, 22 y 50 sin asignar).

Los antígenos F o fimbriales son antígenos superficiales adicionales, cuya identificación es relevante en la caracterización de algunas cepas, especialmente a las

ETEC de origen animal, como es el caso de las cepas ETEC porcinas asociadas DNN y DPD.

ETEC F4 es uno de los principales agentes etiológicos involucrados en la DNN y DPD. Las fimbrias F4 se asocian a los serogrupos O8, O138, O141, O145, O147, O149, O157 en cepas ETEC de la DNN y a los serogrupos O8, O138, O139, O141, O147, O149, O157 en la DPD [2].

### 1.4. *E. coli* enterotoxigénica F4 (K88) (ETEC F4)

Las fimbrias y las enterotoxinas son los principales factores de virulencia de ETEC F4 (K88) involucrados en la patogénesis de la DNN y la DPD.

Las fimbrias son apéndices que se distribuyen sobre la superficie de la bacteria y le permiten adherirse a los tejidos del huésped y se pueden clasificar por su actividad serológica. Han sido denominadas en base a diversos criterios, tales como el origen de las cepas, su estructura o funciones. De la misma manera que se designan los antígenos O y K, se utiliza un sistema de números F para designar a las adhesinas fimbriales. Las fimbrias originalmente denominadas como K88, K99, 987P y F107 son sinónimos de F4, F5, F6 y F18 [19].

Las fimbrias F4 son apéndices proteicos flexibles que se distribuyen peritricamente sobre las bacterias ETEC. Miden aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de longitud, con un diámetro de 2 nm [31]. El antígeno F4 se descubrió por primera vez en 1961 y fue descrito como una sustancia de naturaleza polisacárida, termolábil y capsular (K), por lo cual se lo denominó K88 [32]. Posteriormente, mediante aislamiento y análisis químicos del antígeno se pudo demostrar que estas fimbrias eran en realidad proteínas, en contraste con la naturaleza polisacárida de todos los antígenos capsulares conocidos hasta ese entonces. La denominación F4 se adoptó desde 1983, cuando se implementó un sistema de nomenclatura más simplificado, cambiándose la denominación de K (capsular) por la de F (fimbrial) [33].

El cuerpo de las fimbrias está constituido por cientos de subunidades de proteínas idénticas. Esta región de composición constante se designa como “a” pero, además, existen regiones variables (epítopes) designadas como “b”, “c” o “d” [11]. Como consecuencia de estas diferencias en composición, existen las variantes F4ab, F4ac y F4ad que presentan especificidad de unión a distintos receptores presentes en el epitelio intestinal de los animales. La variante antigénica F4ac es la que predomina en cerdos con DNN y DPD en

distintas partes del mundo, por lo cual frecuentemente se denominan sólo como F4 [2, 34,35].

La función de las fimbrias F4 es esencial en el inicio de la patogénesis en DNN y DPD, ya que les permiten a las bacterias adherirse a las células del epitelio intestinal del huésped. Mediante uniones morfológicamente no destructivas entre las fimbrias y los receptores específicos presentes en el epitelio, las cepas ETEC F4 comienzan a multiplicarse y colonizar el intestino [36].

La susceptibilidad de los animales frente a la infección es determinada, en gran medida, por la presencia de los receptores, y del grado de colonización dependerá si la infección resulta o no en enfermedades diarreicas. Los receptores para F4 son abundantes en cerdos neonatos y su número va disminuyendo con la edad, aunque entre los períodos del destete y post destete la cantidad permanece relativamente constante [37].

Luego de que se establecen las interacciones fimbria-receptor y se produce la colonización del intestino, las bacterias ETEC F4 comienzan a producir enterotoxinas. Éstas son proteínas extracelulares que actúan sobre las células del epitelio intestinal. Las enterotoxinas no producen lesiones o alteraciones morfológicas, sino que inducen cambios funcionales en las células del epitelio del intestino delgado tales como el incremento en la secreción de  $H_2O$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  [38]. Si este exceso de fluido en el intestino delgado no es absorbido en el intestino grueso, puede generar una diarrea. La secreción excesiva conduce a la deshidratación, acidosis metabólica y eventualmente puede producir la muerte del animal.

Las cepas ETEC porcinas producen dos clases principales de enterotoxinas: toxinas termoestables (ST) y termolábiles (LT). Las toxinas ST son de bajo peso molecular, resistentes a 100 °C durante 15 min, y de baja actividad antigénica. Se dividen en base a su tamaño, estructura molecular, y actividad biológica en STa y STb [39]. Las toxinas LT son de alto peso molecular, se inactivan luego de 15 min a 60 °C y son altamente antigénicas. También, las enterotoxinas LT se clasifican en dos subgrupos LTI y LTII [19].

Las cepas ETEC asociadas a la DNN producen sólo la enterotoxina STa y pueden tener una o más fimbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) y F41. La toxina STa es una proteína pequeña, de 18-19 aminoácidos, no inmunogénica, cuyo peso molecular es 2000 Da. Induce la secreción de  $Cl^-$  y  $HCO_3^-$ , e inhibe la absorción de  $Na^+$ . Los efectos de la STa son reversibles, y es activa en el intestino de cerdos de menos de 2 semanas, siendo menos activa en cerdos de mayor edad [40].



A su vez, las cepas ETEC que generan diarrea en el período postdestete o en animales adultos generalmente producen una o más enterotoxinas, incluyendo la toxina STa y STb, LT y una toxina reconocida recientemente como EAST-1 (enterotoxina termoestable enteroagregativa), originalmente encontrada en *E. coli* enteroagregativa de diarreas en humanos [41]. Estas cepas postdestete generalmente tienen las adhesinas fimbriales F4 (K88) o F18 [11].

La toxina STb es un péptido de 48 aminoácidos de 5 KDa, que no se relaciona a la STa en composición ni en mecanismo de acción [42]. La unión de STb a su receptor conduce a la absorción de  $\text{Ca}^{+2}$  dentro de la célula, induciendo la secreción de agua y electrolitos en el duodeno y yeyuno [19].

Por otra parte, las toxinas LT son de alto peso molecular (aproximadamente 84 kDa) y tienen una subunidad A biológicamente activa y cinco subunidades B que se unen a receptores sobre el epitelio intestinal [19].

EAST-1 se identificó primero en *E. coli* enteroagregativas aisladas de humanos. Luego, el gen EAST-1 se detectó en ETEC, *E. coli* enteropatogénica y *E. coli* productora de toxinas *Shiga* de origen humano, bovino y porcino. Es un péptido de 38 aminoácidos de 4.1 KDa. Difiere de STa y STb, aunque comparte el 50 % de homología con STa [43]. El mecanismo de acción de EAST-1 se propone idéntico al de STa, aunque el rol de EAST-1 en el desarrollo de la diarrea aún no ha sido definido [44].

### 1.5. Diagnóstico de DNN y DPD causada por ETEC F4

El diagnóstico de colibacilosis neonatal y postdestete se realiza en base a observaciones clínicas, examen histológico de secciones del intestino delgado, aislamiento bacteriano mediante técnicas convencionales de cultivo y caracterización de sus factores de virulencia por métodos fenotípicos o genotípicos [12].

Con la aparición de los primeros signos clínicos de infecciones entéricas, se realiza un diagnóstico presuntivo inicial considerando, además, el entorno, la alimentación y otros factores que contribuyen al desarrollo de DNN y DPD. Así, se observa, por ejemplo, si la aparición de diarreas ocurre en las primeras horas del nacimiento de los lechones, si las camadas de cerdas primerizas son más afectadas que las demás, si las diarreas causan deshidratación y emaciación, etc. También se considera el porcentaje de animales afectados, las tasas de mortalidad y otros factores que le permiten al veterinario elaborar un cuadro clínico y establecer un diagnóstico presuntivo [2].

La DNN causada por ETEC debe diferenciarse de otras infecciones frecuentes que producen diarrea en este período, entre ellas las producidas por *Clostridium difficile* y *perfringens* tipos A y C, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus y virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. A su vez, la DPD debe diferenciarse de otras causas comunes de diarrea en cerdos destetados, incluyendo rotavirus y *Salmonella*.

Como medidas de diagnóstico complementarias que pueden implementarse a campo se encuentra la determinación del pH fecal, ya que ETEC produce heces alcalinas, mientras que las diarreas producidas por virus producen heces ácidas. Mediante la necropsia, que debe realizarse en las primeras horas posteriores a la muerte de los animales, se observan las lesiones macroscópicas (deshidratación, estómago e intestino dilatado, por ejemplo) y lesiones microscópicas. En este último caso debería observarse la adherencia de bacterias *E. coli* a la mucosa intestinal en determinadas zonas del intestino delgado. La colonización de bacterias *E. coli* en el intestino de cerdos puede observarse mediante técnicas histopatológicas de rutina [2].

Si bien estas herramientas son útiles para realizar un diagnóstico presuntivo inicial a campo, el diagnóstico diferencial definitivo de colibacilosis neonatal o postdestete requiere la confirmación de los serotipos y/o factores de virulencia de ETEC F4 (K88) en muestras de tejidos intestinales o en las heces de animales con diarrea [45].

La identificación de estos microorganismos en muestras de tejidos intestinales puede realizarse mediante tinciones inmunohistoquímicas o inmunofluorescencia indirecta.

Otra alternativa para confirmar el diagnóstico presuntivo es el aislamiento de la bacteria *E. coli* a partir de muestras de hisopado rectal o muestras intestinales y la posterior identificación de los factores de virulencia. La inoculación de dichas muestras sobre medios de cultivo selectivos para *Enterobacteriaceae*, como el agar Mac Conkey, permiten diferenciar bacilos entéricos Gram negativos fermentadores de lactosa. También suelen utilizarse de manera complementaria, medios de cultivo como el agar sangre para observar la actividad hemolítica. Se ha demostrado que las cepas productoras de adhesinas F4, F18 y, en algunos casos, cepas F6 tienen actividad hemolítica sobre agar sangre, mientras que las demás cepas ETEC de cerdos no son hemolíticas [46]. La inoculación de las muestras sobre estos medios de cultivo debe realizarse lo más pronto posible o, en el caso de que transcurran más de 24 h desde el momento en que se toma la muestra hasta su inoculación, se recomienda utilizar medios de transporte, como Stuart, para preservarlas.

Así, la morfología, fermentación de lactosa sobre agar MacConkey (que se visualiza por el crecimiento de colonias rosadas), actividad hemolítica y el olor de las

colonias pueden complementar el diagnóstico presuntivo inicial de colibacilosis de manera rápida. En este contexto, el término rápido implica la incubación de las placas a 37 °C durante al menos 18 h para observar el crecimiento de las colonias.

A partir de una colonia aislada, la identificación de la especie *E. coli* puede realizarse mediante pruebas bioquímicas como la del indol (el 99 % de las cepas *E. coli* son indol positivas), citrato (*E. coli* no utiliza el citrato como única fuente de carbono) y rojo de metilo.

Luego de esta caracterización inicial, las *E. coli* patógenas pueden ser identificadas por tipificación serológica [47]. En este caso, se pueden utilizar antiseros que permitan identificar a los serogrupos ETEC que prevalecen en una región geográfica. Así, se tiene un rápido diagnóstico presuntivo, considerando los serogrupos O generalmente asociados con enfermedades porcinas.

La virotipificación, o la determinación de los factores de virulencia, es la forma definitiva de identificar las cepas *E. coli* patógenas. De esta forma, el diagnóstico de infecciones ETEC F4 se puede realizar en base a la detección de las fimbrias F4 o las enterotoxinas. En ambos casos, las técnicas que se utilizan son las inmunológicas convencionales. Los ensayos de aglutinación, con o sin partículas de latex, son un método simple y fácil para determinar la presencia de adhesinas fimbriales de ETEC [48-50]. También, se han desarrollado para la detección de enterotoxinas los enzima-inmunoensayos (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA) específicos [51,52] o para la detección de las fimbrias F4 [53-55].

Actualmente, los métodos de análisis genotípicos son usados más comúnmente para definir los virotipos involucrados en una infección. Así, uno de los métodos estándar en laboratorios de diagnóstico es el empleo de sondas de genes junto con las técnicas de hibridación. Luego, fueron reemplazados por la aparición de las técnicas de *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) ya que se mejoró notablemente la sensibilidad, especificidad y velocidad en la detección de microorganismos [56]. En la actualidad, PCR es una de las técnicas moleculares más utilizadas para detectar y cuantificar patógenos desde varios tipos de muestras.

En bibliografía se pueden encontrar distintos tipos de ensayos de PCR para la detección de genes de virulencia de *E. coli* en muestras porcinas [57-59]. Entre ellos, formatos donde se realiza la amplificación de un único gen o de múltiples genes de virulencia, en donde la detección se puede realizar mediante electroforesis en gel o utilizando sondas marcadas con fluoresceína o hebras de ADN marcadas con colorantes

fluorescentes. Esta última metodología, denominada Real Time PCR (RT-PCR), presenta mayores ventajas en cuanto a velocidad y menores riesgos de contaminación cruzada frente a otros formatos [60].

Múltiplex PCR es otra de las técnicas muy utilizada, donde se amplifican genes de más de 2 patógenos y/o toxinas. La detección se realiza mediante electroforesis o siguiendo un formato de tiempo real [61].

La técnica PCR tiene notables ventajas frente a las técnicas de cultivo y/o otras técnicas estándar, tales como la especificidad, sensibilidad, rapidez y capacidad de detectar pequeñas cantidades de ácidos nucleicos en una muestra. Sin embargo, como todas las herramientas de diagnóstico, presenta algunas debilidades. En este caso, dependiendo de la aplicación, PCR puede resultar poco práctica y/o poco económica. También presenta la posibilidad de obtener resultados falsos negativos y falsos positivos. Es decir, la gran sensibilidad de PCR y su capacidad para amplificar DNA en millones de copias podrían generar falsos positivos debido a la contaminación a través de los reactivos, pipetas, etc. Por otro lado, los resultados falsos negativos en PCR pueden deberse a los límites físicos de detección de la técnica, a inhibidores de la muestra que interfieren con PCR [62] o, en el caso de infecciones mixtas, se pueden amplificar sólo las bacterias más abundantes y resultar en resultados falsos negativos para los patógenos que están en menor proporción [60].

Como se puede observar, hay una amplia variedad de técnicas para la detección de ETEC F4. Sin embargo, también existe la necesidad de nuevas herramientas que sean simples, pero principalmente rápidas y de aplicación en laboratorios mínimamente equipados y/o en aplicaciones de campo.

El primer paso para prevenir y/o controlar las enfermedades causadas por ETEC F4 es realizar un diagnóstico correcto de las mismas. Considerando la presentación aguda, la evolución de desfavorable a grave de los casos de DNN y DPD y el impacto económico de estas infecciones sobre el mercado porcino, es importante la confirmación temprana del diagnóstico presuntivo inicial mediante técnicas de laboratorio y así elegir el tratamiento más adecuado.

Lo habitual, al observarse los primeros signos clínicos de infecciones por *E. coli*, es comenzar un tratamiento antimicrobiano mientras se esperan los resultados de laboratorio. Esta práctica posiblemente esté fundamentada en la ausencia de técnicas de laboratorio que permitan detectar y cuantificar de manera rápida los factores de virulencia propios de ETEC F4. Sin embargo, de manera similar a lo ocurrido con otros patógenos, el

uso continuado de los antimicrobianos de diferentes familias, ya sea de modo profiláctico o terapéutico, generó el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos tanto de las cepas *E. coli* comensales como patógenas [2]. Esto condujo a una situación conflictiva para los productores porcinos ya que limitó las opciones de tratamiento efectivos para casos posteriores y supone, además, un peligro potencial en la salud pública debido a la posible transferencia de genes resistentes a la droga utilizada dentro de la cadena alimentaria [10]. También, considerando las grandes variaciones en lo que respecta al espectro de sensibilidad en los antimicrobianos para tratar infecciones por *E. coli*, sería beneficioso contar con una herramienta de diagnóstico rápida para elegir de manera oportuna y sensata, el antimicrobiano más adecuado en cada situación particular y evitar complicaciones futuras.

En este contexto, se puede visualizar la necesidad de nuevas herramientas analíticas para diagnosticar las infecciones ocasionadas por ETEC F4 en el ámbito de la salud animal. Así, en esta Tesis Doctoral, se propone el estudio y desarrollo de sensores e inmunosensores electroquímicos que permitan detectar y cuantificar la bacteria ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina. Estos dispositivos se proponen como herramientas sensibles, selectivas, de fácil manipulación que permitan obtener resultados rápidos en laboratorios mínimamente equipados. Por otra parte, debido a la forma en que estas bacterias se diseminan en el ambiente del cerdo, el análisis en muestras de materia fecal porcina podría ser un método no invasivo, económico y de gran utilidad para detectar la presencia del agente infeccioso.

### Referencias

- (1) Thomson, J., Friendship, R.: Digestive system. In *Diseases of Swine*; 10 ed.; Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2012; pp 199-226.
- (2) Fairbrother, J. M., Gyles, C.: Colibacillosis. In *Diseases of Swine*; 10 ed.; Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2012; pp 723-749.
- (3) Carvajal, A., Argüello, H., Costillas, S., Álvarez, L., Miranda, R., Rubio, P.: Control de los principales procesos gastroentéricos en porcinos. En *Sitio Argentino de Producción Animal*: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar), 2013.
- (4) Barton, M. D.: Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* **2000**, *13*, 279-299.
- (5) Budiño, F. E. L., Thomaz, M.C., Kronka, R.N., Nakaghi, L.S.O., Tucci, F.M., Fraga, A.L., Scandolera, A.J., Huaynate, R.A.R.: Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. *Braz. Arch. Biol. Techn.* **2005**, *48*, 921-929.
- (6) Wegener, H. C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Bager, R.: The association between the use of antimicrobial growth promoters and development of resistance in pathogenic bacteria towards growth promoting and therapeutic antimicrobials. *J. Anim. Feed Sc.* **1998**, *7*, 7-14.
- (7) Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., Bosi, P., Oswald, I., Mengheri, E.: Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. *Anim. Res.* **2005**, *54*, 203-218.
- (8) Moxley, R. A., Duhamel, G.E.: Comparative pathology of bacterial enteric diseases of swine. In *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases 2*; Prem, S. P., David, H.F., Ed.; Springer, 1999; pp 83-101.
- (9) Nagy, B., Fekete, P.Z.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* **1999**, *30*, 259-284.

- (10) Frydendahl, K.: Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet. Microbiol.* **2002**, 85, 169-182.
- (11) Fairbrother, J. M., Nadeau, E., Gyles, C.L.: *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* **2005**, 6, 17-39.
- (12) Francis, D. H.: Colibacillosis in pigs and its diagnosis. *Swine Health Prod.* **1999**, 7, 241-244.
- (13) Cooper, V. L.: Diagnosis of neonatal pig diarrhea. *Vet. Clin. N. Am. - Food A.* **2000**, 16, 117-133.
- (14) Charbonneau, G., Murphy, J. Kane, T., Lange, C.: Controlling *E. coli* in the weaned pig. In *London Swine Conference-Building Blocks for the Future*. p; Citeseer, 2004; pp 141-148.
- (15) Lawley, T. D., Walker, A.W.: Intestinal colonization resistance. *Immunology* **2013**, 138, 1-11.
- (16) Arbuckle, J. B.: The distribution of certain *Escherichia coli* strains in pigs and their environment. *Brit. Vet. J.* **1968**, 124, 152-159.
- (17) Sarmiento, J. I., Dean, E. A., Moon, H. W.: Effects of weaning on diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in three-week-old pigs. *Am J Vet Res* **1988**, 49, 2030-2033.
- (18) Van Beers Schreurs, H. M. G., Vellenga, L., Wensing, T., Breukink, H.J.: The pathogenesis of the postweaning syndrome in weaned piglets; a review. *Vet. Quart.* **1992**, 14, 29-34.
- (19) Gyles, C. L., Fairbrother, J.M. : Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4th ed.; Blackwell Publishing, 2010; pp 267-308.
- (20) Hopwood, D. E., Hampson, D.J. : Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning

period. In *Weaning the pig – concepts and consequences*; Pluske, J. R., Le Dividich, J., Verstegen, M.W.A., Ed.: The Netherlands, 2003; pp 199-212.

(21) Tzipori, S., Chandler, D., Smith, M., Makin, T., Hennessy, D.: Factors contributing to postweaning diarrhoea in a large intensive piggery. *Aust. Vet. J.* **1980**, *56*, 274-278.

(22) Madec, F.; Josse, J.: Influence of environmental factors on the onset of digestive disorders of the weaned piglet. *Ann. Rech. Vet* **1983**, *14*, 456-462.

(23) Jung, K., Kim, J., Ha, Y., Choi, C., Chae, C.: The effects of transplacental porcine circovirus type 2 infection on porcine epidemic diarrhoea virus-induced enteritis in preweaning piglets. *Vet. J.* **2006a**, *171*, 445-450.

(24) Jung, K., Ahn, K., Chae, C.: Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Res. Vet. Sci.* **2006b**, *81*, 310-315.

(25) Song, D. S., Kang, B.K., Oh, J.S., Ha, G.W., Yang, J.S., Moon, H.J., Jang, Y.S., Park, B.K.: Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J. Vet. Diag. Invest.* **2006**, *18*, 278-281.

(26) Madigan, M. T., Martinko, J.M, Parker, J. Brock.: *Biología de los Microorganismos.*; 10 ed., Ed. Pearson Educación, 2003.

(27) Hinton, M., Hampson, D.J., Hampson, E., Linton, A.H.: A comparison of the ecology of *Escherichia coli* in the intestine of healthy unweaned pigs and pigs after weaning. *J. Appl. Bacteriol.* **1985**, *58*, 471-477.

(28) Katouli, M., Lund, A., Wallgren, P., Kühn, I., Söderlind, O., Möllby, R.: Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods. *Appl. Environ. Microb.* **1995**, *61*, 778-783.

(29) Kaper, J. B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T.: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 123-140.



- (30) Nataro, J. P., Kaper, J.B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 142-201.
- (31) Klemm, P., Schembri, M.A.: Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* **2000**, *290*, 27-35.
- (32) Orskov, I., Orskov, F., Sojka, W.J., Leach, J.M.: Simultaneous occurrence of *E. coli* B and L antigens in strains from diseased swine. Influence of cultivation temperature. Two new *E. coli* K antigens: K 87 and K 88. *Acta Pathol. Mic. Sc.* **1961**, *53*, 404.
- (33) Van Den Broeck, W., Cox, E., Oudega, B., Goddeeris, B.M.: The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet. Microbiol.* **2000**, *71*, 223-244.
- (34) Westerman, R. B., Mills, K.W., Phillips, R.M., Fortner, G.W., Greenwood, J.M.: Predominance of the ac variant in K88-positive *Escherichia coli* isolates from swine. *J. Clin. Microbiol.* **1988**, *26*, 149-150.
- (35) Choi, C., Chae, C.: Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac, and ad) in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *Vet. Microbiol.* **1999**, *67*, 307-310.
- (36) Devriendt, B.; Stuyven, E.; Verdonck, F.; Goddeeris, B. M.; Cox, E.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) induce proinflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells. *Dev. Comp. Immunol.* **2010**, *34*, 1175-1182.
- (37) De Greve, H., Wyns, L., Bouckaert, J.: Combining sites of bacterial fimbriae. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2007**, *17*, 506-512.
- (38) Blanco, M., Blanco, J.E., Gonzalez, E.A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T.A., Zerbini, L.F., Yano, T., de Castro, A.F., Blanco, J.: Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O: K: H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 2958-2963.
- (39) Burgess, M. N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A., Newsome, P.M.: Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* **1978**, *21*, 526-531.

- (40) Lallier, R., Bernard, F., Gendreau, M., Lazure, C., Seidah, N.G., Chretien, M., St-Pierre, S.A.: Isolation and purification of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin of porcine origin. *Anal. Biochem.* **1982**, 127, 267-275.
- (41) Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A., Francis, D.: Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet. Microbiol.* **2007**, 123, 145-152.
- (42) Dubreuil, J. D.: *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* **1997**, 143, 1783-1795.
- (43) Veilleux, S., Dubreuil, J.D.: Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet. Res.* **2006**, 37, 3-13.
- (44) Ménard, L. P., Dubreuil, J.D.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit. Rev. Microbiol.* **2002**, 28, 43-60.
- (45) Cox, E., Loos, M., Coddens, A., Devriendt, B., Melkebeek, V., Vanrompay, D., Goddeeris, B.M.: Post-weaning *E. coli* infections in pigs and importance of the immune system. In *Actualites en production porcine*: Maisons-Alfort, Francia, 2012.
- (46) Nagy, B.; Nagy, G.; Meder, M.; Mocsari, E.: Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. *Acta Vet. Hung.* **1995**, 44, 9-19.
- (47) Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S.G., Sack, R.B.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, 18, 465-483.
- (48) Alexa, P., Hamřík, J., Konstantinová, L, Srámková-Zajacová, Z.: Experimental infection of weaned piglets with enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: F4. *Acta Vet. Brno* **2012**, 80, 337-341.
- (49) Mullaney, C. D., Francis, D.H., Willgoos, J.A.: Comparison of seroagglutination, ELISA, and indirect fluorescent antibody staining for the detection of K99, K88, and 987P pilus antigens of *Escherichia coli*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1991**, 3, 115-118.

- (50) Murray, C. J.: Detection of K88 and K99 fimbrial antigens on *Escherichia coli* by coagglutination. *Aust. Vet. J.* **1987**, 64, 239-240.
- (51) Lockwood, D. E., Robertson, D.C.: Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (ST a). *J. Immunol. Methods* **1984**, 75, 295-307.
- (52) Zhang, W., Berberov, E.M., Freeling, J., He, D., Moxley, R.A., Francis, D.H.: Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infect. Immun.* **2006**, 74, 3107-3114.
- (53) Mills, K. W., Tietze, K.L., Phillips, R.M.: Use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of K88 pili in fecal specimens from swine. *Am J Vet Res* **1983**, 44, 2188-2189.
- (54) Osek, J., Svennerholm, A.M.: Determination of K88 antigens and enterotoxins of *Escherichia coli* strains isolated from Polish piglets with diarrhea by the use of enzyme-linked immunosorbent assays. *Vet. Microbiol.* **1991**, 29, 299-307.
- (55) Payne, D., Moore, N., Lambert, P.: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure the expression of the K88 fimbrial antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *J. Immunol. Methods* **1993**, 159, 283-289.
- (56) Mothershed, E. A., Whitney, A.M.: Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin. Chim. Acta* **2006**, 363, 206-220.
- (57) Chapman, T. A.; Wu, X.-Y.; Barchia, I.; Bettelheim, K. A.; Driesen, S.; Trott, D.; Wilson, M.; Chin, J. J.-C.: Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microb.* **2006**, 72, 4782-4795.
- (58) Do, T.; Stephens, C.; Townsend, K.; Wu, X.; Chapman, T.; Chin, J.; McCormick, B.; Bara, M.; Trott, D.: Rapid identification of virulence genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates associated with diarrhoea in Queensland piggeries. *Aust. Vet. J.* **2005**, 83, 293-299.

- (59) West, D. M., Sprigings, K.A., Cassar, C., Wakeley, P.R., Sawyer, J., Davies, R.H.: Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan® PCR assays. *Vet. Microbiol.* **2007**, 122, 323-331.
- (60) Cai, H. Y., Caswell, J.L., Prescott, J.F. : Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: A diagnostic laboratory perspective. *Vet. Pathol.* **2014**, 51, 341-350.
- (61) Lee, S., Kang, S., Kang, M., Yoo, H.: Development of multiplex polymerase chain reaction assays for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli* and their application to field isolates from piglets with diarrhea. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2008**, 20, 492-496.
- (62) Maurer, J. J.: Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2011**, 2, 259-279.

### HIPOTESIS

El mecanismo de transferencia directa de electrones entre células de ETEC F4 y el electrodo puede ser aplicado al desarrollo de sensores bioelectroanalíticos para el monitoreo inicial de poblaciones bacterianas. En función de resultados recientes, es de esperar que las señales electroquímicas del sustrato se incrementen significativamente sobre electrodos modificados con especies de distinta naturaleza.

Por otra parte, se prevé que los anticuerpos específicos para *Escherichia coli* sean componentes biológicos adecuados para la preparación de inmunoelectrodos, empleando métodos electroquímicos para su detección selectiva.

### OBJETIVOS

#### Objetivos generales

Estudiar y desarrollar sensores e inmunosensores electroquímicos para la detección cuantitativa de *Escherichia coli* enterotoxigenica. Lograr conocimientos vinculados a las propiedades de electrodos nanoestructurados y su aplicación al desarrollo de nuevas técnicas electroanalíticas más rápidas, sensibles, selectivas y económicas que las actuales en vigencia para la especie bajo estudio, en áreas de alta demanda como lo es la de sanidad animal (muestras de origen porcino).

#### Objetivos específicos

a) Estudiar las características bioelectroquímicas de *Escherichia coli* enterotoxigenica, a través de la interacción directa microorganismo-electrodo, y su aplicación en el desarrollo de sensores bioanalíticos para la detección de la bacteria.

b) Diseñar y estudiar nuevos bioelectrodos, inmovilizando sobre la superficie de electrodos que involucren nanoestructuras (nanotubos de carbono, monocapas autoensambladas de tioles, nanopartículas de oro, partículas magnéticas, etc.), anticuerpos específicos que permitan la detección y cuantificación de la bacteria enterotoxigenica *Escherichia coli*.

c) Caracterizar los bioelectrodos resultantes y determinar los parámetros típicos de los mismos.

d) Aportar conocimientos relacionados con el desarrollo de nuevas metodologías analíticas en la determinación selectiva de cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* en muestras de origen porcino, basados, fundamentalmente, en el diseño y desarrollo de sensores e inmunosensores electroquímicos y en técnicas voltamperométricas.

e) Evaluar las aplicaciones analíticas de las metodologías desarrolladas para la detección y cuantificación de estos compuestos de interés en los sistemas de sanidad animal.

f) Validar los métodos electroquímicos desarrollados por comparación con los métodos analíticos oficiales actualmente en vigencia.

### CAPITULO 2. CONCEPTOS Y FUNDAMENTOS TEORICOS

#### 2.1. Sensores y biosensores electroquímicos

La exactitud y rapidez en la identificación del agente etiológico involucrado en una infección bacteriana son de vital importancia en el área de sanidad humana y animal. Así, se puede seleccionar oportunamente el tratamiento más apropiado para dicha infección y comenzarlo tan pronto como sea posible. Los métodos actuales más utilizados para la detección de bacterias en muestras clínicas (cultivo, PCR, métodos inmunológicos) son muy precisos, aunque presentan limitaciones en términos de tiempo, costos y complejidad [1].

La necesidad de disponer de un diagnóstico exacto y a tiempo en infecciones bacterianas dio origen a numerosas investigaciones sobre sensores y biosensores. Como herramienta de diagnóstico, el objetivo es desarrollar dispositivos simples, rápidos, de bajo costo, miniaturizables (o prototipos con potencialidad de miniaturización) que puedan aplicarse en muestras con procedimientos mínimos de preparación.

En la bibliografía pueden encontrarse distintos formatos de biosensores para la detección de microorganismos con aplicaciones en diagnóstico clínico y también para monitoreo ambiental y bioprocesos [2,3], control de calidad de alimentos [4], agricultura y bioterrorismo [5].

Un sensor químico se define, de manera general, como un dispositivo que tiene dos componentes principales: una plataforma de reconocimiento, química o biológica, y un elemento de transducción. La plataforma de reconocimiento interactúa con el analito de interés y los cambios químicos que ocurren como consecuencia de esta interacción son convertidos por el elemento de transducción en una señal medible [6].

Los biosensores son un tipo de sensores que se caracterizan por tener elementos de reconocimiento biológicos, tales como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos u otros biorreceptores que, inmovilizados sobre el transductor, otorgan una gran selectividad al dispositivo [6].

Los tres tipos principales de sensores y biosensores utilizados comúnmente en análisis clínicos son los electroquímicos, ópticos y piezoeléctricos, los que se diferencian entre sí en base al principio de transducción [7].

Los sensores electroquímicos monitorean especies electroactivas las que son producidas o consumidas por la acción de elementos biológicos, y utilizan principios de transducción potenciométricos, amperométricos o impedimétricos. En los sensores ópticos la señal analítica se debe a la interacción del analito con el transductor basado en propiedades ópticas tales como la absorbancia, reflectancia, luminiscencia, fluorescencia, índice de refracción y resonancia de plasmones superficiales. Por otra parte, los sensores piezoeléctricos miden la masa depositada en la superficie de un cristal piezoeléctrico, detectando la variación en la frecuencia de resonancia característica del cristal [8]. De estos transductores, aquel basado en el principio electroquímico es el más utilizado tanto en sensores como en biosensores clínicos [9,10] debido a las ventajas que presentan frente a los otros. Entre ellas, es posible el diseño de dispositivos simples, fáciles de usar, económicos, en algunos casos descartables, sensibles en matrices complejas y miniaturizables [11].

Por otra parte, los recientes avances en nanotecnología han conducido al empleo de distintos tipos de nanomateriales en dispositivos electroquímicos para la detección de bacterias, ya sea mediante la modificación de la superficie de electrodos y/o su utilización como elementos de marcado. Con la inclusión de nanomateriales en el desarrollo de biosensores electroquímicos se pretende mejorar la sensibilidad debido a la amplificación de la señal, el aumento del área superficial disponible para la interacción con el analito de interés, como así también por las propiedades electrónicas, mecánicas y ópticas características de las nanoestructuras utilizadas [12].

A continuación se presentan los fundamentos teóricos que condujeron al desarrollo de un sensor bioelectroanalítico (electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple) y a un magneto-inmunosensor electroquímico, en la presente Tesis Doctoral. Ambos sensores permitieron la detección y cuantificación de la bacteria ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina, utilizando la técnica de voltamperometría de onda cuadrada.

### 2.2. Sensores bioelectroquímicos

Simultáneamente a la búsqueda de alternativas para mejorar el desempeño de los biosensores, la necesidad de obtener información inmediata sobre la presencia de patógenos dio lugar a investigaciones para el desarrollo de sensores bioelectroquímicos [5],



de manera de satisfacer la demanda creciente de análisis microbianos rápidos y directos. Las investigaciones se orientaron, principalmente, a estudiar y optimizar el intercambio de electrones microbianos con dispositivos electrónicos externos debido al amplio rango de aplicaciones potenciales [13]. Entre estas aplicaciones se encuentran la cuantificación de bacterias, monitoreo del crecimiento celular y evaluación de la resistencia de las bacterias frente a determinados agentes antimicrobianos [14-16].

Las principales características de los sensores bioelectroquímicos son la simplicidad en su diseño y rapidez en la detección. Para su construcción se utilizan, generalmente, electrodos modificados con nanomateriales, como los nanotubos de carbono [16,17]. La señal que se obtiene se debe a la interacción directa entre el microorganismo y el electrodo. Con estos dispositivos se pretende superar algunas de las limitaciones que presentan la mayoría de los biosensores relacionadas con el elemento de bioreconocimiento. Si bien los biosensores otorgan una sensibilidad y, fundamentalmente, una selectividad superior, tienen una vida y estabilidad limitada [18] y los procesos de inmovilización de los bioreceptores generalmente son difíciles de reproducir para su fabricación en mayor escala [19].

Los sensores bioelectroquímicos no utilizan elementos de reconocimiento biológicos que garanticen la selectividad en la detección de microorganismos. Sin embargo, permiten obtener información inmediata sobre crecimiento microbiano y los procesos o el estado fisiológico de los microorganismos. Como herramienta de diagnóstico, su aplicación permitiría conocer el riesgo de exposición frente a un determinado patógeno, realizar un monitoreo inicial de poblaciones bacterianas, evaluar el efecto de antimicrobianos, *etc.*

La modificación de superficies de electrodos en el desarrollo de sensores bioelectroquímicos junto con el empleo de herramientas quimiométricas y la aplicación de técnicas electroquímicas de pulso, han permitido mejorar notablemente la sensibilidad y el tiempo requerido para la detección y cuantificación de microorganismos. También, se logró la diferenciación entre especies de microorganismos y géneros de bacterias como *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, entre otras [20,21]. De esta manera, los sensores bioelectroquímicos se proponen como una herramienta alternativa y/o complementaria a los métodos convencionales que requieran largos tiempos para el cultivo y aislamiento de microorganismos. Luego de una identificación inicial a nivel especie, se necesitan de otras herramientas de diagnóstico, ya sean convencionales o tecnología de

biosensores, que otorguen información selectiva y precisa sobre la patogenicidad de una cepa en particular.

### 2.2.1. Interacción microorganismo-electrodo

La bioelectroquímica consiste en el estudio de los procesos electroquímicos que ocurren en sistemas biológicos, en relación a sus características morfológicas y fisiológicas [22]. La aplicación de este concepto en técnicas analíticas para monitorear la presencia de bacterias patógenas no es reciente. De hecho, desde hace varios años se utilizan sistemas basados en impedancia microbiológica en la industria alimenticia para la detección de bacterias, de manera rápida y automatizada. En estos sistemas de impedancia microbiológica se emplean electrodos sumergidos en un medio de cultivo que permite el crecimiento selectivo de la bacteria de interés. La liberación de metabolitos iónicos durante el crecimiento bacteriano producen cambios en conductancia y capacitancia, y así se obtienen señales detectables dentro de las 24 h ó cuando la concentración de bacterias oscila entre  $10^6$ -  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> [23]. El sistema de impedancia microbiológica fue aprobado, en 1992, por la *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC) como el primer método oficial para el monitoreo de *Salmonella* en muestras de alimentos [24] y, desde entonces, han sido comercializados varios dispositivos [25]. De esta manera, se puede detectar en alimentos la presencia y viabilidad de bacterias patógenas.

En los últimos años, los procesos de transferencia de electrones entre microorganismos vivos y la superficie de electrodos han sido estudiados por diversos autores utilizando otras técnicas electroquímicas, además de la impedancia. Así, los conocimientos sobre la interacción microorganismo-electrodo se han aplicado para el desarrollo de herramientas de diagnóstico mediante el monitoreo de la actividad microbiana [26,27] y también en el desarrollo de celdas de combustible microbianas [28,29].

En los sistemas bioelectroquímicos, microorganismos electroquímicamente activos transfieren electrones a los electrodos. Esta transferencia puede ser directa o indirecta, utilizando, en este último caso, moléculas externas al microorganismo que actúen como mediadoras para transferir los electrones [30].

En los sistemas de transferencia directa, generalmente existe el contacto directo entre ciertas proteínas redox microbianas (como los citocromos o nanocables bacterianos), ubicados sobre la membrana externa de las células y la superficie del electrodo [31]. Otros mecanismos por los cuales ocurre la transferencia directa de electrones desde los microorganismos al electrodo son la producción de moléculas electroactivas solubles que son liberadas al medio [13], y la participación de la cadena de transporte de electrones, relacionada con la respiración microbiana [27].

Por otra parte, en los sistemas indirectos se utilizan moléculas electroactivas exógenas (naturales o artificiales) que actúan como intermediarias en la comunicación microbio-electrodo. Estos sistemas son los que se utilizan comúnmente en la detección de patógenos [32].

Sin embargo, desde el punto de vista práctico, el enfoque más simple es un sistema electroquímico sin mediadores, basado en la transferencia de electrones desde un microorganismo electroquímicamente activo y la superficie del electrodo. Debido a que estas reacciones de transferencia ocurren a bajas velocidades [30], una alternativa para superar estas limitaciones es la utilización de materiales conductores para la modificación de los electrodos.

Por lo tanto, a fin de optimizar la interacción microorganismo-electrodo y conseguir una mayor sensibilidad, los electrodos pueden modificarse con distintos nanomateriales y realizar la detección mediante técnicas electroquímicas convencionales, como la voltamperometría cíclica, y las técnicas electroquímicas de pulso de potencial, como la voltamperometría de onda cuadrada [33].

### 2.2.2. Nanotubos de carbono

El descubrimiento de materiales nanoestructurados, tales como nanopartículas, nanocables o nanotubos, posibilitó un avance significativo en el desarrollo de nuevos métodos e instrumentación para análisis químicos. En aplicaciones analíticas, los electrodos modificados con nanomateriales se utilizan, generalmente, con la finalidad de mejorar la sensibilidad, selectividad y estabilidad de los dispositivos. Así, el empleo de los nanotubos de carbono (NTC) en sensores y biosensores ha sido un hecho significativo para la química electroanalítica [34].

Los NTC se construyen a partir de unidades de carbono con hibridación  $sp^2$  y presentan una estructura hexagonal [35]. Pueden ser de pared simple (NTCPS), los cuales podrían describirse como una hoja de grafito enrollada en escala nanométrica, o de paredes múltiples (NTCPM) en el caso de tratarse de tubos de grafito concéntricos y cerrados, con múltiples capas de hojas de grafito [36]. Ambas estructuras presentan propiedades únicas que favorecieron su empleo en la modificación de electrodos convencionales. Los sensores electroquímicos modificados con NTC se aplicaron para la determinación de moléculas biológicas como citocromos [37], NADH [38] y bacterias [16].

Entre las propiedades de los NTCPM, pueden mencionarse una alta conductividad eléctrica y una alta relación superficie/volumen, además de alta resistencia mecánica. Las ventajas de utilizar NTC en medidas electroquímicas se relacionan con el aumento del área superficial y aumento de la velocidad de transferencia de electrones. De esta manera, se consigue una interesante actividad electrocatalítica, asociada con la estructura electrónica y defectos topológicos presentes sobre la superficie [39].

Para ser utilizados en aplicaciones (bio) analíticas, los NTC deben dispersarse. Si bien una característica de los NTC es su insolubilidad en la mayoría de los solventes, la preparación de dispersiones homogéneas y uniformes de NTC es de gran importancia para modificar los electrodos. Sin dispersiones homogéneas, se verían afectadas tanto las propiedades electroquímicas como mecánicas de los NTC, como también la reproducibilidad de los sensores resultantes.

Así, algunas formas de dispersarlos han requerido la funcionalización de las paredes o los extremos finales de los NTC [40], el uso de surfactantes y sonicado [41] o el uso de polímeros [42,43]. Estos métodos han sido eficientes para conseguir dispersiones homogéneas, aunque generalmente implican la ruptura de los NTC en partes más pequeñas, dependiendo del tiempo de sonicado y/o el tratamiento de funcionalización [44]. Este efecto es más significativo en el caso de los NTCPS.

Es común, a la hora de generar dispersiones homogéneas, la utilización de polímeros solubles, los cuales tienen la capacidad de rodear y estabilizar individualmente los NTC. Así se suelen emplear polímeros sintéticos, como los polifluorados (nafion) o las poliaminas, como también los naturales como el quitosano [36].

En solventes acuosos, puede utilizarse el Nafion (tetrafluoroetileno sulfonatado) para dispersar fácilmente los NTCPM y así depositarlos de manera uniforme sobre la superficie del electrodo, conservando sus propiedades [45].

Debido a sus propiedades de intercambio iónico y biocompatibilidad, las películas de Nafion han sido muy utilizadas para modificar las superficies de electrodos y para la construcción de biosensores amperométricos [43]. De manera similar a otros polímeros que se usan para solubilizar los NTC, el Nafion posee una cadena lateral polar y permite la dispersión de los NTC en soluciones amortiguadoras de fosfatos o alcohol [46].

La combinación de las propiedades de los NTCPM y el Nafion mejoran los procesos de transporte de masa y la transferencia de carga debido al incremento del área de la interfaz electrodo-suspensión [47], sin afectar las propiedades electrocatalíticas de los NTC.

### 2.3. Biosensores electroquímicos – generalidades

Los biosensores son dispositivos analíticos que integran un elemento de reconocimiento biológico (o bioreceptor) con un mecanismo de transducción físicoquímico [48]. El bioreceptor interactúa con el analito de interés, reconociendo su presencia, su actividad o su concentración en la solución. Esta interacción y los cambios químicos que genera son convertidos por el elemento de transducción en una señal eléctrica medible [49].

Los biosensores pueden clasificarse en base a distintos criterios, como se indica en la Tabla 2.1. Los distintos criterios de clasificación se basan en el tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito, la detección utilizada para detectar dicha interacción, la naturaleza del elemento de reconocimiento o el sistema de transducción.

**Tabla 2.1.** Criterios de clasificación de los biosensores.

Clasificación de Biosensores			
Tipo de interacción	Elemento de reconocimiento	Detección de la interacción	Sistema de transducción
Biocatalítica	Enzima	Directa	Electroquímico
	Orgánulo, tejido o célula		Óptico
	Receptor biológico		
Bioafinidad	Anticuerpos	Indirecta	Piezoeléctrico

	Acidos nucleicos		Termométrico
	Aptámeros		

Dependiendo de la naturaleza del proceso de reconocimiento biológico, los biosensores se pueden clasificar en biocatalíticos, en donde se utilizan enzimas, células o tejidos como biocomponentes, o biosensores de afinidad, que utilizan anticuerpos, ácidos nucleicos o aptámeros, inmovilizados sobre la superficie del elemento transductor.

Estos elementos de reconocimiento pueden acoplarse a distintos tipos de transductores. Como ya se mencionó, los transductores más comunes son los ópticos, electroquímicos, termométricos, piezoeléctricos y magnéticos. De ellos, los electroquímicos son muy utilizados en el desarrollo de sensores y biosensores para aplicaciones clínicas [10,50] debido a las ventajas que presentan frente a los otros, entre ellas la potencialidad y facilidad con que pueden ser miniaturizados.

### 2.3.1. Inmunosensores electroquímicos

Los inmunosensores son biosensores de afinidad que muestran una gran selectividad debido a la reacción de unión anticuerpo-analito. Se basan en reacciones inmunológicas que implican el reconocimiento del antígeno mediante el sitio de unión de un anticuerpo para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Este proceso de reconocimiento biomolecular está gobernado principalmente por la forma y tamaño del receptor y el analito [6]. La interacción puede dar origen a una señal analítica, la cual se convierte en una respuesta físicoquímica mediante un transductor apropiado.

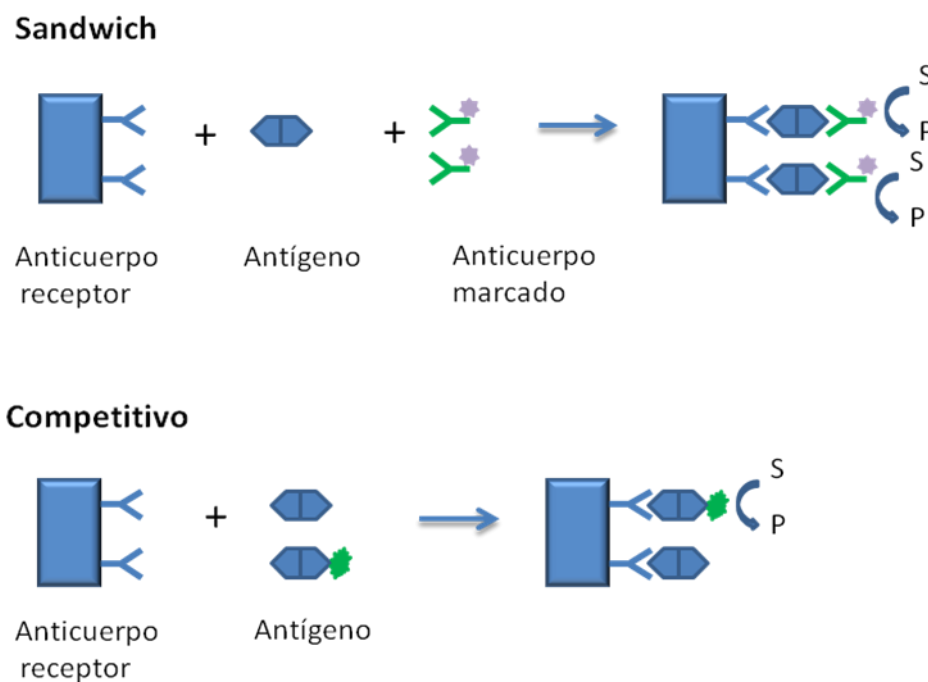
En los inmunosensores electroquímicos (IEs) el evento de formación del complejo antígeno-anticuerpo es convertido en una señal electroquímica: una corriente eléctrica (inmunosensores amperométricos), una diferencia de potencial (inmunosensores potenciométricos) o un cambio en resistividad (inmunosensores conductimétricos), cuya magnitud de la respuesta es proporcional a la cantidad de antígeno [6].

Los IEs más utilizados son los amperométricos y, en ellos, se utiliza un anticuerpo (o antígeno) marcado con una enzima. Esto se debe a que la interacción del antígeno con el anticuerpo, por lo general, no da lugar a un evento electroactivo. Así, la enzima que se utilice para marcar el bioelemento actúa sobre un sustrato y genera un

producto electroactivo que puede detectarse amperométricamente, y cuya concentración mantiene una relación directa con la concentración del antígeno.

Los elementos de reconocimiento más utilizados son los anticuerpos, aunque en los últimos años se han desarrollado biosensores de reconocimiento empleando péptidos, hebras de ADN o aptámeros. Los transductores electroquímicos más comúnmente utilizados son aquellos formados por metales (oro, platino), semiconductores (óxido de indio estaño, óxido de iridio) o materiales de carbono (pasta de carbono, carbono vítreo, grafito) [51].

Si bien existen distintos formatos para los ensayos empleando inmunosensores, los más utilizados son los formatos sándwich, que tienden a ser más sensibles y robustos, y el formato competitivo (Figura 2.1.) [52]



**Figura 2.1.** Inmunosensores tipo sándwich y competitivo.

Los inmunosensores tipo sándwich se emplean para medir antígenos de gran tamaño que puedan unirse a dos o más anticuerpos. Se utiliza un anticuerpo de captura (Ab), el cual se inmoviliza sobre el transductor y se une al antígeno (Ag), y un anticuerpo marcado con una enzima (Ab\*) que se unirá al complejo antígeno-anticuerpo de captura. De esta manera se forma un complejo Ab-Ag-Ab\*. Luego de eliminar el Ab\* que no

reaccionó, el complejo de Ab-Ag-Ab\* se coloca en una solución que contenga el sustrato para la enzima y se detecta electroquímicamente el producto de la reacción enzimática.

En un inmunosensor competitivo el antígeno en la muestra (analito) compite con un antígeno marcado con una enzima (Ag\*) por los sitios de unión de una cantidad limitada de anticuerpo inmovilizado en una fase sólida. Después de completarse la reacción, se realizan pasos de lavado para eliminar los componentes que no reaccionaron, se agrega una solución de sustrato enzimático y se mide electroquímicamente el producto de la reacción. Debido a la naturaleza competitiva del ensayo, la señal que se obtiene es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

En los IEs para la detección de bacterias generalmente se emplean formatos tipo sándwich, debido a las características de los antígenos presentes en las mismas. Las enzimas que más se utilizan para el marcado de los anticuerpos son la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina [6]. Algunas alternativas al empleo de enzimas para marcar los anticuerpos pueden ser nanopartículas metálicas [53], *quantum dots* y polímeros electroactivos, como la polianilina [54], entre otros.

Para la detección de microorganismos patógenos, también existen otros formatos de biosensores amperométricos que se basan en el metabolismo microbiano. Así, se pueden medir reacciones bioquímicas que ocurren durante procesos metabólicos en las células bacterianas o detectar enzimas específicas de un grupo de microorganismos. Esta estrategia permitió el desarrollo de técnicas espectrofotométricas para la detección de bacterias coliformes en muestras de agua, donde se detecta la presencia de la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa o  $\beta$ -D-galactosidasa utilizando sustratos cromogénicos. Debido al tiempo requerido para confirmar la presencia de estas bacterias, se desarrollaron biosensores electroquímicos donde se utilizan sustratos que, catalizados por alguna de estas enzimas, genera productos electroactivos. Este formato fue el que se utilizó en la presente Tesis Doctoral en el desarrollo de un inmunosensor para ETEC F4 y el principio de operación se describe en el Capítulo 5.

En todos los formatos de inmunosensores, el procedimiento empleado para inmovilizar la capa de reconocimiento sobre los electrodos es uno de los factores claves para obtener una buena sensibilidad y reproducibilidad.



### 2.3.2. Anticuerpos

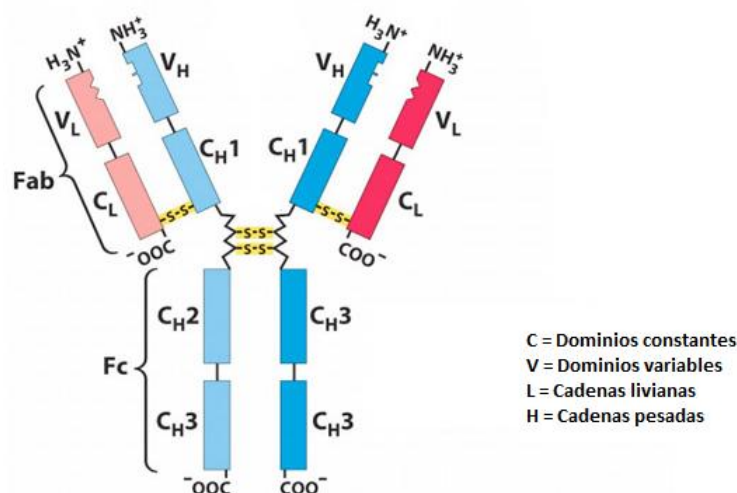
Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), son proteínas globulares complejas producidas por un organismo frente a moléculas que el mismo reconoce como “extrañas” o “no propias”. Cualquier configuración molecular que pueda generar la síntesis de anticuerpos se conoce como antígeno. La superficie de una sola célula, tal como una célula bacteriana, puede tener cierto número de antígenos diferentes, cada uno de los cuales puede provocar la producción de un anticuerpo específico [55].

Existen tres formas por las cuales los anticuerpos actúan comúnmente contra los invasores para permitir que el organismo los elimine: 1) pueden recubrir a las partículas extrañas y hacer que se aglomeren, de modo tal que puedan ser capturadas por células fagocíticas; 2) pueden combinarse con ellas de modo tal que interfieran sobre alguna actividad vital o 3) ellos mismos, combinándose con otros componentes de la sangre conocidos colectivamente como complemento, pueden descubrir las células extrañas [55].

La gran selectividad de los anticuerpos se basa en la estereoespecificidad del sitio de unión del antígeno y es reflejado por las grandes constantes de unión del complejo antígeno-anticuerpo formado. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los primeros se producen a partir de un único clon de células productoras de anticuerpos y así, estos, mostrarán la misma afinidad. Los anticuerpos policlonales, al contrario, poseen afinidades variables y reconocen diferentes regiones del antígeno. Generalmente, estos anticuerpos son más económicos [6].

Un anticuerpo está formado por cuatro cadenas proteicas: dos de ellas son cadenas pesadas (H) y las otras dos son cadenas livianas (L), las cuales poseen dominios variables (V) y constantes (C), como se puede ver en la Figura 2.2. Las cadenas pesadas se organizan en cuatro dominios VH, CH1, CH2 y CH3, y las livianas se dividen en dos dominios VL y CL. Los anticuerpos se dividen en varias clases que se identifican según el tipo de cadena pesada en: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.

La porción de la molécula que une, mediante enlaces disulfuro, a los dominios CH1 y CH2 se denomina región bisagra.



**Figura 2.2.** Estructura de un anticuerpo.

En la estructura de un anticuerpo pueden distinguirse las regiones Fc, que corresponde al extremo constante de las dos cadenas pesadas, las que terminan en extremos carboxilatos, y la Fab donde se encuentra el grupo N-terminal de las cadenas pesadas y livianas.

### 2.3.3. Inmovilización de anticuerpos sobre transductores electroquímicos

La inmovilización de la capa de reconocimiento es uno de los factores más importantes para la fabricación de IEs. Debido a que los sitios activos de un anticuerpo están en los segmentos Fab, la orientación ideal de los anticuerpos inmovilizados requiere que el fragmento Fc esté orientado hacia la superficie del electrodo y los fragmentos Fab orientados hacia la solución. Conseguir esta orientación y mantener la conformación de la proteína y su actividad es uno de los principales desafíos en la construcción de IEs.

Algunas de las técnicas utilizadas comúnmente para inmovilizar anticuerpos sobre los distintos electrodos son:

- **Inmovilización física:** se basa en la adsorción de proteínas sobre la superficie del electrodo por interacciones no covalentes, principalmente fuerzas electrostáticas, interacciones iónicas e hidrofóbicas. Generalmente se obtienen uniones débiles con lo cual puede ocurrir la desorción de los anticuerpos y, por otra parte, la orientación del anticuerpo inmovilizado sea al azar.

Para aumentar la unión de las proteínas a la superficie del electrodo, se han desarrollado varias estrategias basadas en el atrapamiento de las proteínas en una matriz polimérica [51].

- Inmovilización covalente: Las uniones covalentes se forman principalmente entre los grupos funcionales expuestos en las cadenas terminales de los anticuerpos (carboxilos, amino) con electrodos modificados adecuadamente. Las uniones que se forman son irreversibles y, generalmente, se produce un alto porcentaje de recubrimiento de la superficie del transductor. La modificación de electrodos de carbono puede realizarse activando electroquímicamente la superficie de los mismos, resultando en grupos carboxilos para la unión con las aminos de proteínas. Otra alternativa para modificar los electrodos es usar reactivos bifuncionales de entrecruzamiento. Algunos de estos son glutaraldehído, cationes de diazonium, derivados de tioles y varios polímeros sobre superficies modificadas con diferentes grupos funcionales reactivos [51].

La inmovilización covalente presenta grandes ventajas en la fabricación de IEs relacionadas principalmente con la estabilidad de los sensores. Sin embargo, la superficie de los transductores no suele ser regenerable y puede alterarse la estructura de los anticuerpos, conduciendo a una pérdida total o parcial de la actividad de las proteínas debido a la orientación al azar y deformaciones estructurales. Así, para mejorar la eficiencia en la inmovilización de las proteínas se suelen utilizar nanomateriales o procedimientos de inmovilización orientada o bioafinidad.

- Inmovilización orientada: aquí, los anticuerpos de captura se inmovilizan de tal forma que sus sitios de reconocimiento quedan distribuidos uniformemente y expuestos a la solución. Para controlar la orientación de los anticuerpos y mejorar el desempeño de los IEs se han desarrollado varias estrategias. Una de ellas requiere la preparación de fragmentos Fab de los anticuerpos para depositarlos sobre superficies de oro mediante grupos tiol localizados en la región bisagra. Así, los tioles quedan unidos a la superficie del sensor y el sitio de unión del antígeno está lejos del transductor, resultando en una mayor accesibilidad y actividad de las moléculas inmovilizadas [51].

Otra alternativa para orientar los anticuerpos es la utilización de sistemas de bioafinidad. Entre ellos lectinas y sistemas con proteínas A o G [56]. Las proteínas A o G se utilizan como agentes de captura para orientar correctamente los anticuerpos debido a que se unen, con una alta afinidad, a la región Fc de las inmunoglobulinas. El fragmento Fab, o el sitio de unión al antígeno, queda expuesto hacia el exterior, lográndose una mejor

orientación con respecto a la adsorción física o uniones covalentes. De esta forma se consigue una inmovilización orientada de anticuerpos con una mejora significativa en la capacidad de unión del antígeno, logrando un IE de mayor sensibilidad y estabilidad.

La elección del procedimiento de inmovilización de anticuerpos estará fundamentada, en principio, en las características del sistema a determinar y el transductor que se utilice. En algunos sistemas puede requerirse una máxima sensibilidad mientras que en otros se requiera mayor robustez o bajo costo. Por lo tanto, es conveniente seleccionar el procedimiento más adecuado para inmovilizar el anticuerpo de captura en función de su aplicación.

### 2.3.4. Partículas magnéticas en IEs

El uso de partículas magnéticas (PM) en inmunosensores electroquímicos ha permitido superar algunas de las limitaciones en la inmovilización de anticuerpos que afectan la sensibilidad de los dispositivos. Estas limitaciones se relacionan con la complejidad de las técnicas utilizadas para la inmovilización del bioreceptor, los costos asociados a los procedimientos y la imposibilidad de reutilizar la superficie del electrodo, lo cual influye sobre la aplicación de biosensores en sistemas automatizados [57,58].

De esta manera, con las PM se ha mejorado notablemente la performance de los IEs mediante procedimientos muy simples y se consiguen ventajas adicionales, entre ellas:

- Se incrementa el área superficial de los transductores, lo cual aumenta la capacidad de unión antígeno-anticuerpo y permite aumentar la sensibilidad [59].
- La cinética del ensayo es más rápida cuando las partículas están en suspensión ya que disminuyen las distancias de difusión del analito, por lo que se puede disminuir el tiempo del ensayo [58].
- La utilización de un campo magnético externo para orientar las PM sobre la superficie del electrodo disminuye los inconvenientes relacionados con la inmovilización de anticuerpos de manera orientada.
- La superficie del electrodo puede ser regenerada fácilmente alternando la ubicación del campo magnético externo [60].
- Las etapas del proceso de inmunoreacción ocurren separadas del proceso de detección electroquímica, lo cual facilita la transducción del evento de afinidad.

Las PM comerciales que generalmente se utilizan en los inmunoensayos pueden estar funcionalizadas o no. En este último caso, para poder utilizarlas deberán modificarse con grupos que permitan la unión de las inmunoglobulinas.

Los métodos más comunes para inmovilizar los anticuerpos incluyen la utilización de PM cubiertas con streptavidina (o avidina) y anticuerpos conjugados con biotina [61], reacciones de amidación entre grupos amino de los anticuerpos y PM funcionalizadas con carboxilo ó a la inversa [62] y PM recubiertas con proteína A o proteína G [60].

Por otra parte, la utilización de PM en el desarrollo de inmunosensores electroquímicos está asociada al empleo de electrodos impresos, permitiendo conseguir importantes ventajas relacionadas con la miniaturización del sistema electroquímico.

### Referencias

- (1) Kaittanis, C.; Santra, S.; Perez, J. M.: Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2010**, *62*, 408-423.
- (2) Emde, K. M. E., Mao, H., Finch, G.R.: Detection and occurrence of waterborne bacterial and viral pathogens. *Water Environ. Res.* **1992**, *64*, 641-647.
- (3) Theron, J., Cilliers, J., Du Preez, M., Brözel, V.S., Venter, S.N.: Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation–pit-stop semi-nested PCR procedure. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89*, 539-546.
- (4) Patel, P. D.: (Bio) sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 96-115.
- (5) Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N., Chaudhury, A.: Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *28*, 1-12.
- (6) Wang, J.: *Analytical Electrochemistry*; 3rd ed.: J. Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.
- (7) Singh, R., Mukherjee, M., Sumana, G., Gupta, R., Sood, S., Malhotra, B.: Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis. *Sensor Actuat. B- Chem.* **2014**, *197*, 385-404.
- (8) Farré, M., Kantiani, L., Pérez, S., Barceló, D.: Sensors and biosensors in support of EU Directives. *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 170-185.
- (9) Justino, C. I. L., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T.A.P.: Chapter Three- Immunosensors in Clinical Laboratory Diagnostics. *Adv. Clin. Chem.* **2016**, *73*, 65-108.
- (10) Bahadir, E. B., Sezgintürk, M.K.: Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta* **2015**, *132*, 162-174.
- (11) Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S., Chakravorty, D.: Detection of microorganisms using biosensors—a smarter way towards detection techniques. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 661-667.

- (12) Gilmartin, N., O'Kennedy, R.: Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens. *Enzyme Microb. Tech.* **2012**, 50, 87-95.
- (13) Lovley, D. R.: Electromicrobiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **2012**, 66, 391-409.
- (14) Chalenko, Y., Shumyantseva, V., Ermolaeva, S., Archakov, A.: Electrochemistry of *Escherichia coli* JM109: Direct electron transfer and antibiotic resistance. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 32, 219-223.
- (15) Rodríguez, J., Ramírez, A.S., Suárez, M.F., Soto, C.Y.: Electrochemical monitoring of the metabolic activity of mycobacteria in culture. *Anton. Leeuw.* **2012**, 102, 193-201.
- (16) Xiao, X., Zhu, G., Liao, L., Liu, B., Yuan, Y., Wang, Y., He, J., He, B., Wu, Y.: A square wave voltammetric method for the detection of microorganism populations using a MWNT-modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* **2012**, 74, 105-110.
- (17) Peng, L., You, S.J., Wang, J.Y.: Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 1248-1251.
- (18) Ronkainen, N. J., Halsall, H.B., Heineman, W.R.: Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1747-1763.
- (19) Pejcic, B., De Marco, R., Parkinson, G.: The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. *Analyst* **2006**, 131, 1079-1090.
- (20) Han, S., Li, X., Guo, G., Sun, Y., Yuan, Z.: Voltammetric measurement of microorganism populations. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 405, 115-121.
- (21) Carpani, I., Conti, P., Lanteri, S., Legnani, P.P., Leoni, E., Tonelli, D.: Direct quantification of test bacteria in synthetic water-polluted samples by square wave voltammetry and chemometric methods. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 959-964.
- (22) Bagotsky, V. S.: *Fundamentals of electrochemistry*; 2 ed.; John Wiley & Sons, 2005; Vol. 44.

- (23) McMeekin, T. A.: *Detecting pathogens in food*; Woodhead Publishing Limited: North America, 2003.
- (24) Gibson, D. M., Coombs, P., Pimbley, D.W.: Automated conductance method for the detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. *J. AOAC Int.* **1992**, 75, 293-302.
- (25) Yang, L., Bashir, R.: Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnol. Adv.* **2008**, 26, 135-150.
- (26) Kang, J., Kim, T., Tak, Y., Lee, J.H., Yoon, J.: Cyclic voltammetry for monitoring bacterial attachment and biofilm formation. *J. Ind. Eng. Chem.* **2012**, 18, 800-807.
- (27) Hassan, R. Y. A., Bilitewski, U.: Direct electrochemical determination of *Candida albicans* activity. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 49, 192-198.
- (28) Schaetzle, O., Barrière, F., Baronian, K.: Bacteria and yeasts as catalysts in microbial fuel cells: electron transfer from micro-organisms to electrodes for green electricity. *Energ. Environ. Sci.* **2008**, 1, 607-620.
- (29) Logan, B. E.: Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 375-381.
- (30) Hassan, R. Y. H., H.N., Abdel-Aziz, M.S., Khaled, E.: Nanomaterials-based microbial sensor for direct electrochemical detection of *Streptomyces Spp.* *Sens. Actuat. B-Chem.* **2014**, 203, 848-853.
- (31) Yang, Y., Xu, M., Guo, J., Sun, G.: Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Proc. Biochem.* **2012**, 47, 1707-1714.
- (32) Chaubey, A., Malhotra, B.D.: Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 441-456.
- (33) Mirceski, V., Gulaboski, R., Lovric, M., Bogeski, I., Kappl, R., Hoth, M.: Square-Wave Voltammetry: A review on the recent progress. *Electroanal.* **2013**, 25, 2411-2422.
- (34) Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M.: Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: a review. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 622, 11-47.



- (35) Zhao, Q., Gan, Z., Zhuang, Q.: Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. *Electroanal.* **2002**, *14*, 1609-1613.
- (36) Rivas, G. A., Rubianes, M.D., Rodriguez, M.C., Ferreyra, N.F., Luque, G.L., Pedano, M.L., Miscoria, S.A., Parrado, C.: Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. *Talanta* **2007**, *74*, 291-307.
- (37) Wang, J., Li, M., Shi, Z., Li, N., Gu, Z.: Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1993-1997.
- (38) Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., Lin, Y.: Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 743-746.
- (39) Zhou, O., Shimoda, H., Gao, B., Oh, S., Fleming, L., Yue, G.: Materials science of carbon nanotubes: fabrication, integration, and properties of macroscopic structures of carbon nanotubes. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 1045-1053.
- (40) Tasis, D., Tagmatarchis, N., Georgakilas, V., Prato, M.: Soluble carbon nanotubes. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4000-4008.
- (41) Islam, M. F., Rojas, E., Bergey, D.M., Johnson, A.T., Yodh, A.G.: High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 269-273.
- (42) Star, A., Stoddart, J.F., Steuerman, D., Diehl, M., Boukai, A., Wong, E.W., Yang, X., Chung, S.W., Choi, H., Heath, J.R.: Preparation and properties of polymer-wrapped single-walled carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1721-1725.
- (43) O'Connell, M. J., Boul, P., Ericson, L.M., Huffman, C., Wang, Y., Haroz, E., Kuper, C., Tour, J., Ausman, K.D., Smalley, R.E.: Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *342*, 265-271.

- (44) Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Pérez, B., del Valle, M., Alegret, S.: New materials for electrochemical sensing VI: carbon nanotubes. *TRAC-Trend Anal. Chem.* **2005**, *24*, 826-838.
- (45) Hu, C., Yuan, S., Hu, S.: Studies on electrochemical properties of MWNTs-Nafion composite films based on the redox behavior of incorporated Eu <sup>3+</sup> by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 3013-3021.
- (46) Wang, J., Musameh, M., Lin, Y.: Solubilization of carbon nanotubes by Nafion toward the preparation of amperometric biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2408-2409.
- (47) Tsai, Y. C., Chen, J.M., Li, S.C., Marken, F.: Electroanalytical thin film electrodes based on a Nafion<sup>TM</sup>-multi-walled carbon nanotube composite. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 917-922.
- (48) Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S.: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121-131.
- (49) Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S.: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 2333-2348.
- (50) Justino, C. I., Rocha-Santos, T.A., Duarte, A.C.: Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 1172-1183.
- (51) Wan, Y., Su, Y., Zhu, X., Liu, G., Fan, C.: Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *47*, 1-11.
- (52) Pei, X., Zhang, B., Tang, J., Liu, B., Lai, W., Tang, D.: Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 1-18.
- (53) Afonso, A. S., Pérez-López, B., Faria, R.C., Mattoso, L.H., Hernández-Herrero, M., Roig-Sagués, A.X., Maltez-da Costa, M., Merkoçi, A.: Electrochemical detection of *Salmonella* using gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40*, 121-126.

- (54) Setterington, E. B., Alcocilja, E.C.: Rapid electrochemical detection of polyaniline-labeled *Escherichia coli* O157: H7. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 2208-2214.
- (55) Curtis, H., Barnes, N.S.: *Biología*; 5ta ed.; Ed. Médica Panamericana, 1993.
- (56) Jung, Y., Jeong, J.Y., Chung, B.H.: Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. *Analyst* **2008**, 133, 697-701.
- (57) Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Chevolot, Y., Cloarec, J.P.: Biosensors and bio-bar code assays based on biofunctionalized magnetic microbeads. *Sensors* **2007**, 7, 589-614.
- (58) Centi, S., Laschi, S., Mascini, M.: Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads. *Talanta* **2007**, 73, 394-399.
- (59) Rosi, N. L., Mirkin, C.A.: Nanostructures in biodiagnostics. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547-1562.
- (60) Xu, Y., Wang, E.: Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. *Electrochim. Acta* **2012**, 84, 62-73.
- (61) Liébana, S., Lermo, A., Campoy, S., Barbé, J., Alegret, S., Pividori, M.I.: Magneto immunoseparation of pathogenic bacteria and electrochemical magneto genosensing of the double-tagged amplicon. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 5812-5820.
- (62) Piao, Y., Jin, Z., Lee, D., Lee, H.J., Na, H.B., Hyeon, T., Oh, M.K., Kim, J., Kim, H.S.: Sensitive and high-fidelity electrochemical immunoassay using carbon nanotubes coated with enzymes and magnetic nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 3192-3199.

## CAPITULO 3. FUNDAMENTOS Y TECNICAS ELECTROQUIMICAS

### 3.1. Introducción

La electroquímica relaciona los efectos químicos y eléctricos de un sistema y puede abarcar distintos fenómenos, como electroforesis y corrosión, dispositivos como sensores electroanalíticos, baterías y celdas de combustible, tecnologías como la producción de aluminio y cloro, entre otros [1]. El conocimiento sobre los principios fundamentales de las reacciones de electrodos y las propiedades de la interfaz electrodo-solución ha permitido utilizar los métodos electroquímicos para estudiar estos sistemas.

Dentro de la electroquímica, las técnicas electroanalíticas relacionan propiedades eléctricas cuantificables (corriente, potencial o carga) con parámetros químicos. De esta manera, pueden encontrarse aplicaciones con fines analíticos en el monitoreo ambiental, control de calidad industrial, análisis clínico, etc [2].

Las medidas electroanalíticas pueden clasificarse en potenciométricas o potenciostáticas. La potenciometría abarca técnicas estáticas (corriente cero) donde se mide el potencial establecido a través de una membrana y así se obtiene información sobre la composición de una muestra. Mediante la utilización de membranas selectivas, se pueden monitorear varias especies iónicas presentes en una muestra dada, tales como protones, calcio, flúor, potasio, etc [3].

Por otra parte, las técnicas potenciostáticas o técnicas de potencial controlado son técnicas dinámicas (corriente distinta de cero) que se basan en los procesos de transferencia de carga en la interfaz electrodo-solución. Se aplica un determinado potencial a un electrodo para favorecer una reacción de transferencia de electrones (ya sea de oxidación o reducción) y se mide la corriente resultante. Esta corriente refleja la velocidad a la cual los electrones se transportan a través de la interfase electrodo-solución. Las ventajas de las técnicas de potencial controlado incluyen alta sensibilidad, selectividad hacia las especies electroactivas, amplio intervalo lineal, portabilidad e instrumentación de bajo costo [4].

#### 3.2. Sistemas electroquímicos

A diferencia de los sistemas químicos donde las reacciones ocurren en el seno de una solución, los procesos electroquímicos ocurren en una interfase electrodo-solución constituyendo sistemas heterogéneos. De esta manera, para realizar determinaciones electroquímicas, ya sean potenciostáticas o potenciométricas, se requiere de una celda electroquímica constituida por, al menos, dos electrodos que actúen como conductores y una solución o electrolito soporte que permita establecer el contacto entre los mismos y contenga al analito de interés.

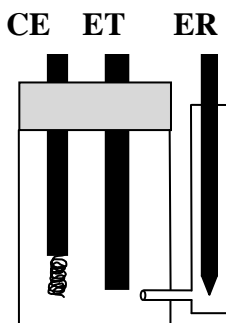
Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos, se favorece la oxidación o reducción de un compuesto electroactivo. En consecuencia, la distribución de cargas en la interfase electrodo/solución es distinta a la del seno de la solución y se producen dos tipos de procesos:

- Procesos faradaicos: responden a la ley de Faraday, la cual establece que la magnitud del cambio químico causado por el flujo de corriente es proporcional a la cantidad de carga que pasa a través de la interfase.
- Procesos no faradaicos: ocurren sin transferencia de electrones a través de la interfase electrodo-solución, generando una corriente transitoria denominada corriente no faradaica o corriente de cargado de la doble capa. Generalmente, se asocian a corrientes capacitivas, de adsorción o relacionadas con fenómenos de superficie (pseudocapacitivas) [5].

Mediante la utilización de un potenciostato, pueden establecerse los valores de potencial que favorezcan los procesos faradaicos y de esta manera tener un mayor control sobre los procesos de electrodo. Sin embargo, también deben considerarse los procesos no faradaicos y sus efectos sobre la superficie del electrodo para obtener una información completa del sistema.

##### 3.2.1. Celdas electroquímicas

En las experiencias a potencial controlado, las celdas que generalmente se emplean contienen tres electrodos sumergidos en una solución que contiene al analito de interés (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Esquema de celda electroquímica de tres electrodos.

En el electrodo de trabajo (ET) ocurren los fenómenos electroquímicos de interés y, generalmente, se construyen a partir de material inerte como Pt, Au o carbono. El electrodo de referencia (ER) proporciona un potencial conocido, constante y reproducible (independiente de la composición de la muestra) frente al cual se compara el potencial del ET. Está compuesto por las formas oxidadas y reducidas de un determinado par redox, como  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$  (electrodo de plata-cloruro de plata) o  $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Cl}^-$  (electrodo de calomel) y de esta manera se consigue un efecto “amortiguador” frente a los cambios de potencial que ocurren en la celda electroquímica. El ER se mantiene en un compartimento separado de la solución que contiene el analito de interés, pero está conectado al cuerpo principal de la celda mediante un pequeño capilar. En el electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE) ocurren las hemirreacciones opuestas a las del electrodo de trabajo, a fin de mantener la electroneutralidad en estos sistemas heterogéneos. El CE es un material conductor inerte de gran área, como puede ser un alambre de platino enrollado. Así, la densidad de corriente en el CE será casi nula y la corriente total de la celda se deberá a los procesos que se generan en el ET [6].

Además de los electrodos, se requiere de un electrolito soporte que permita disminuir la resistencia de la solución, y por lo tanto la caída de potencial no compensada entre el ET y el ER. También, el electrolito soporte permite establecer una fuerza iónica uniforme en la solución y asegurar que el espesor de la doble capa eléctrica sea mucho menor con respecto a la capa de difusión. La elección del electrolito soporte depende principalmente de la solubilidad del analito y su actividad redox, y de las propiedades como conductividad eléctrica, actividad electroquímica y reactividad química. El electrolito soporte no debería reaccionar con el analito (o productos) y no debería experimentar reacciones electroquímicas en un amplio rango de potencial. En las

experiencias con el sensor bioelectroanalítico que se describen en este trabajo, el electrolito soporte fue una solución amortiguadora de fosfatos salina 10 mM pH 7 (SAFS), mientras que en el desarrollo del magneto-inmunosensor se utilizó solución amortiguadora de fosfatos 0,05 M pH 6 (SAF).

#### 3.2.2. Electrodo de trabajo

A fin de seleccionar un electrodo de trabajo para determinaciones analíticas deben considerarse dos factores principales: el comportamiento redox del analito de interés y la corriente de *background* en la región de potencial donde se realizarán las experiencias [4]. De esta manera, se podrán obtener una alta relación señal/ruido y superficies reproducibles. Otras características del ET que también deben tenerse en cuenta son la ventana de potencial en la cual pueden utilizarse los electrodos, su conductividad eléctrica, propiedades mecánicas, costo, disponibilidad y toxicidad.

El carbono o metales nobles, como el platino y el oro, son algunos de los materiales que se utilizan frecuentemente como ET para aplicaciones de sensores u otras metodologías para la detección de diferentes analitos.

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron dos tipos de electrodos de carbono. Para el desarrollo del sensor bioelectroanalítico se trabajó con electrodos de carbono vítreo desnudos y modificados con dispersiones de NTCPM. Mientras que, para el magneto-inmunosensor se utilizaron electrodos de capa impresa de carbono (ECIC).

En general, los electrodos de carbono presentan una amplia ventana de potencial de trabajo, baja corriente de *background*, bajo costo y escasa reactividad química. Si bien las velocidades de transferencia de electrones son menores con respecto a los electrodos metálicos, pueden mejorarse realizando un adecuado pretratamiento.

En los electrodos de carbono vítreo, el pretratamiento que se realiza comúnmente consiste en el pulido con partículas de alúmina de tamaños menores a 0.05  $\mu\text{m}$  y el lavado del electrodo con agua desionizada. De esta manera, se consiguen superficies activas y reproducibles ya que se eliminan los contaminantes superficiales y nuevas capas de carbono se exponen en la interfaz, mejorando la capacidad para transferir electrones [4].

En la actualidad, la superficie de los electrodos de carbono se modifica para otorgarle nuevas propiedades. Así, dependiendo del material que se utilice para la modificación, se pueden acelerar las reacciones de transferencia de electrones, mejorar la

selectividad, sensibilidad o estabilidad de los dispositivos electroquímicos. Los nanotubos de carbono, como ya se describieron en el capítulo 2, son uno de los nanomateriales que presentan interesantes propiedades mecánicas, electrónicas y químicas para aplicaciones analíticas [7].

Por otra parte, los electrodos de capa impresa son muy utilizados en el desarrollo de sensores y biosensores debido a que presentan numerosas ventajas frente a los electrodos y celdas convencionales. Se fabrican mediante tecnologías que consisten en la deposición capa-por-capas de tintas sobre un sustrato sólido (soportes plásticos o cerámicos) y mediante el uso de plantillas se define la geometría del sensor. Algunas ventajas del modo de fabricación son la flexibilidad en el diseño del electrodo, automatización del proceso, buena reproducibilidad y amplia posibilidad de elección de materiales [8]. La composición de las tintas comerciales utilizadas para imprimir los ET, CE y ER puede modificarse fácilmente posibilitando la aplicación de estos electrodos en distintas áreas. En comparación con otras metodologías de fabricación, es muy económica, simple y acorde a la producción en gran escala [9]. De esta manera, se compensan las limitaciones relacionadas con el efecto de memoria que presenta la superficie de estos electrodos y que disminuyen su vida útil.

Así, los electrodos de capa impresa se pueden considerar como celdas miniaturizadas y descartables sobre los cuales se colocan volúmenes muy pequeños, del orden de microlitros, de muestra.

Las tintas que se utilizan para la impresión de los electrodos de carbono están compuestas de partículas de grafito, aglutinantes poliméricos y otros aditivos necesarios para la dispersión y también para los procesos de impresión y adhesión [10]. Estas características en la composición de las tintas de carbono comerciales pueden ocasionar bajas velocidades en la transferencia de electrones heterogénea. Por lo tanto, al igual que en los electrodos convencionales, es necesario realizar un tratamiento previo. Se ha demostrado que el preacondicionamiento electroquímico de ECIC, mediante la aplicación de potenciales anódicos durante cortos períodos de tiempo utilizando un medio básico, es una forma simple y efectiva de activar los electrodos e incrementar la actividad electroquímica de un amplio conjunto de procesos redox [11].

En resumen, la tecnología de los electrodos de capa impresa representa una alternativa fácil y económica para la fabricación de dispositivos electroquímicos a gran escala. Como herramienta analítica, permitirían realizar análisis rutinarios rápidos, *in situ* y



en tiempo real en distintos campos de aplicación como la industria alimenticia, medio ambiente, diagnóstico clínico, entre otras. Sin embargo, algunos procedimientos críticos para su utilización en biosensores como la biofuncionalización de los ECI, requieren de mayor investigación para ser optimizados [12]. En esta Tesis Doctoral, se propone utilizar procedimientos de captura inmunomagnética en reemplazo de las metodologías convencionales para inmovilizar los elementos de reconocimiento sobre la superficie del electrodo.

#### 3.3. Técnicas electroquímicas

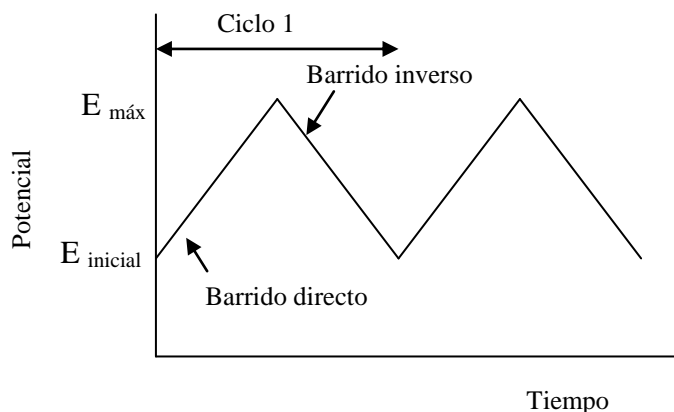
Se utilizaron técnicas electroquímicas de potencial controlado en las cuales se mide la corriente en respuesta a un potencial aplicado. La corriente eléctrica puede ser de oxidación, cuando hay una transferencia de electrones desde el analito hacia el electrodo de trabajo, o de reducción si la transferencia de electrones ocurre desde el electrodo de trabajo hacia el analito [1].

En este trabajo se utilizaron la voltamperometría cíclica (VC), para los estudios iniciales realizados con el sensor bioelectroanalítico, y voltamperometría de onda cuadrada (VOC) para el desarrollo y optimización del sensor bioelectroanalítico y el magneto-inmunosensor.

##### 3.3.1. Voltamperometría cíclica

La VC es una técnica ampliamente utilizada para adquirir información cualitativa sobre las reacciones electroquímicas, permitiendo visualizar los potenciales redox de especies electroactivas y evaluar el efecto del medio sobre los procesos redox [<sup>4</sup>]. También se puede obtener información termodinámica, conocer la cinética de reacción de transferencia de electrones y de las reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción si existiesen. Generalmente, para un sistema electroquímico desconocido, los primeros estudios se realizan utilizando voltamperometría cíclica a fin de caracterizar la reacción de transferencia electrónica.

Se aplica un programa de barrido triangular del potencial, como se ilustra en la Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Programa de potencial en el tiempo que se aplica al electrodo de trabajo en voltamperometría cíclica.

El potencial aplicado varía linealmente con el tiempo desde un potencial inicial ( $E_{\text{inicial}}$ ) donde no ocurren reacciones faradaicas, hasta un valor máximo ( $E_{\text{máx}}$ ) donde se invierte el sentido de barrido del potencial hasta un potencial final, que puede ser el mismo que el inicial u otro. Durante los barridos, el potenciostato registra la corriente resultante como consecuencia del potencial aplicado [1].

Dependiendo del estudio que se quiera realizar, se pueden aplicar uno o varios ciclos, puede modificarse la velocidad de barrido y el sentido del mismo puede iniciarse en una dirección anódica o catódica.

Como respuesta a la perturbación en potencial, se obtiene un voltamperograma cíclico que consiste en graficar la corriente generada en función del potencial aplicado.

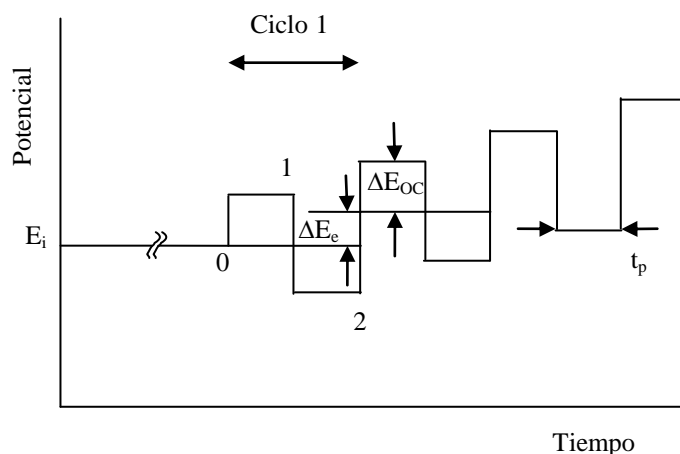
En los estudios realizados con el sensor bioelectroanalítico, la VC se utilizó para observar el efecto de la modificación del electrodo sobre las corrientes capacitivas y analizar las respuestas obtenidas de las suspensiones de ETEC F4 en una ventana de potencial de 0 a 1 V vs Ag/AgCl a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . De esta manera, se seleccionó el electrodo de trabajo para las experiencias posteriores.

### 3.3.2. Voltamperometría de onda cuadrada

La VOC es una técnica de pulso de potencial diferencial que posee una gran sensibilidad debido a la forma en que se muestrea la corriente. Así, para procesos reversibles, la corriente medida es mayor que para el proceso directo o inverso [4] y se eliminan las corrientes capacitivas o de blanco. También, la forma y posición de la señal de

corriente diferencial es independiente de la geometría que controla la difusión y el transporte convectivo de la materia [13].

El potencial se aplica en forma de una onda cuadrada simétrica y de gran amplitud (25 - 100 mV), superpuesta sobre un potencial de base escalonado, como se representa en la Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Perturbación de potencial en el tiempo que se aplica al electrodo de trabajo en voltamperometría de onda cuadrada.

La forma de la onda cuadrada se caracteriza por la altura del pulso o amplitud ( $\Delta E_{oc}$ ), el incremento de barrido de escalera ( $\Delta E_e$ ), el período de la onda ( $\tau$ ) y el tiempo de pulso ( $t_p$ ). El  $t_p$  puede describirse alternativamente en términos de la frecuencia ( $f$ ), siendo  $f = 1/2t_p$ . Un parámetro adicional que puede variarse es el tiempo de demora ( $t_d$ ) antes de que se aplique la onda de potencial en el tiempo.

La corriente se mide dos veces durante cada ciclo de la onda cuadrada, una vez al final del pulso directo (1), dando lugar a la corriente directa, y también al final del pulso inverso (2), generando una corriente inversa. La diferencia entre las corrientes directa e inversa se denomina corriente neta y es la que se representa gráficamente en función del potencial. De esta forma, eligiendo adecuadamente los parámetros de la onda, se elimina en gran parte la contribución de la corriente capacitiva y se obtiene una mayor sensibilidad.

La VOC fue la técnica que se utilizó para realizar las experiencias de optimización tanto del sensor bioelectroanalítico como del magneto-inmunosensor. Asimismo, las

curvas de calibrado y las determinaciones en muestras de materia fecal porcina utilizando ambos sensores fueron realizadas con esta técnica.

#### Referencias

- (1) Bard, A. J., Faulkner, L.R.: *Electrochemical methods: fundamentals and applications*; Wiley New York, 2001; 2da Ed.
- (2) Brett, C. M.: Electroanalytical techniques for the future: the challenges of miniaturization and of real-time measurements. *Electroanal.* **1999**, *11*, 1013-1016.
- (3) Skoog, D. A., West, D.M., Holler, F.J.: *Fundamentos de química analítica*; Ed. Reverté, 1997; Vol. 2.
- (4) Wang, J.: *Analytical Electrochemistry*; 3rd ed.: J. Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.
- (5) Bagotsky, V. S.: *Fundamentals of electrochemistry*; 2 ed.; John Wiley & Sons, 2005; Vol. 44.
- (6) Oldham, K., Myland, J.: *Fundamentals of electrochemical science*; Elsevier, 2012.
- (7) Baughman, R. H., Zakhidov, A.A., de Heer, W.A.: Carbon nanotubes-the route toward applications. *Science* **2002**, *297*, 787-792.
- (8) Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M.A., Arcos-Martínez, M.J.: Disposable electrochemical biosensors in microbiology. *Talanta* **2007**, *73*, 202-219.
- (9) Timur, S., Seta, L.D., Pazarlioğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A.: Screen printed graphite biosensors based on bacterial cells. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1325-1329.
- (10) Wang, J., Pedrero, M., Sakslund, H., Hammerich, O., Pingarron, J.: Electrochemical activation of screen-printed carbon strips. *Analyst* **1996**, *121*, 345-350.
- (11) Wang, J., Tian, B., Nascimento, V.B., Angnes, L.: Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 3459-3465.
- (12) Ahmed, M. U., Hossain, M.M., Safavieh, M., Wong, Y.L., Rahman, I.A., Zourob, M., Tamiya, E.: Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *36*, 495-505.

- (13) Osteryoung, J. G., Osteryoung, R.A.: Square wave voltammetry. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 101A-110A.

### CAPITULO 4. SENSOR BIOELECTROANALITICO

#### 4.1. Consideraciones generales

Durante el desarrollo del sensor bioelectroanalítico se realizaron distintas experiencias que condujeron a la detección y cuantificación de ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina.

En primer lugar, se analizó el comportamiento electroquímico de suspensiones de bacterias con distintos electrodos: carbono vítreo desnudo (CV), CV modificado con NTCPM dispersos en agua (CV/NTCPM) y dispersos en agua-Nafión (CV/NTCPM-Nafión). Las técnicas electroquímicas que se utilizaron fueron VC y VOC.

Se trabajó con suspensiones de bacterias vivas y también con suspensiones bacterianas sometidas a lisis celular y se analizaron los posibles mecanismos que intervienen en la transferencia directa de electrones entre la bacteria y el electrodo.

Finalmente, se realizaron curvas de calibrado utilizando suspensiones de bacterias preparadas en SAFS y también se cuantificó la bacteria en muestras de materia fecal porcina.

El diseño empleado en este tipo de sensores podría resultar útil para el monitoreo inicial de poblaciones bacterianas, debido a la simplicidad y rapidez que presenta con respecto a otras técnicas convencionales, aunque podría presentar limitaciones en cuanto a la selectividad. Por lo tanto, para la detección de los factores de virulencia de cepas ETEC sería necesario utilizar herramientas complementarias, ya sean técnicas convencionales o biosensores.

#### 4.2. Materiales y Reactivos

**Medios de Cultivo:** Los medios de cultivos sólidos y líquidos que se utilizaron fueron adquiridos deshidratados (Britania). La esterilización se realizó en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

Caldo Tripteína Soja (CTS): Es un medio líquido de enriquecimiento que favorece el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. Está compuesto por tripteína y peptona de soja (aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, minerales y

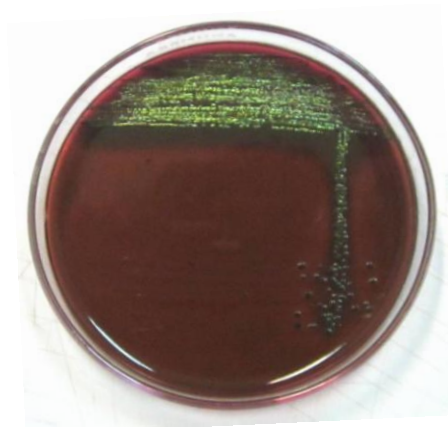
vitaminas), NaCl (mantiene el balance osmótico),  $K_2HPO_4$  (otorga capacidad reguladora) y glucosa (fuente de energía).

Agar Tripteína Soja (ATS): Medio de cultivo sólido que favorece el desarrollo de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Posee similar composición que el CTS, pero sin glucosa y  $K_2HPO_4$ . En la Figura 4.1 se muestran las colonias de ETEC F4 sobre este medio.



**Figura 4.1.** Colonias aisladas de ETEC F4 sobre agar tripteína soja.

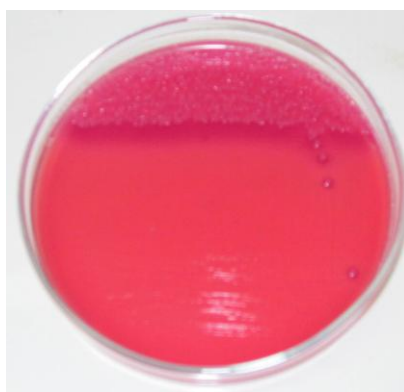
Agar Eosina Azul de Metileno (EMB): Se utiliza como medio selectivo y diferencial para el aislamiento de enterobacterias Gram negativas. Los principales componentes son la lactosa y sacarosa (fuentes de energía) y los colorantes eosina y azul de metileno que actúan como indicadores de pH e inhibidores del crecimiento de bacterias Gram positivas. Las bacterias fermentadoras de lactosa como *E. coli* acidifican el medio y las colonias se observan de color negro azuladas con un brillo verdoso, como se puede observar en la Figura 4.2.



**Figura 4.2.** Colonias aisladas de ETEC F4 sobre agar eosina azul de metileno



Agar Mac Conkey: Este medio selectivo y diferencial se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras clínicas, aguas y alimentos. Contiene cristal violeta y sales biliares como inhibidores de microorganismos Gram positivos, lactosa como hidrato de carbono fermentable y peptonas que aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento e indicador rojo neutro. Por fermentación de lactosa, disminuye el pH alrededor de las colonias de *E. coli* produciendo el cambio de color del indicador de pH, la absorción en las colonias y la precipitación de las sales biliares alrededor de las mismas. Las colonias de bacterias fermentadoras de lactosa se observan rosadas, como se muestra en la Figura 4.3, y, las que no fermentan, se observan incoloras.



**Figura 4.3.** Colonias aisladas de ETEC F4 sobre agar Mac Conkey.

**Agente Crioprotector:** Se utilizó glicerol (Biopack) esterilizado en autoclave para la preparación del stock del cultivo.

**Reactivos para Tinción de Gram:** Se adquirió el kit para Tinción de Gram, marca Britania, el cual está compuesto por solución de violeta de genciana (cristal violeta) al 0,2 %; solución de lugol concentrada 10X; solución decolorante constituida por partes iguales de alcohol y acetona; solución de safranina al 0,25 %. El lugol concentrado se diluyó 1/10 antes de su uso.

**Cepa ETEC F4:** La cepa de referencia ETEC FV10188 fue cedida por el grupo de Biotecnología Animal de la Fac. de Agronomía y Veterinaria (FAyV) de la UNRC, quienes la obtuvieron de un aislamiento regional. Posteriormente realizaron su caracterización molecular en el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Lugo – España) [1] y mediante análisis por PCR se determinó que presenta los factores de virulencia F4, F18,

LT y STb. La cepa se conservó en viales con caldo tripteína soja y glicerol al 30 %, a -20 °C.

**Muestras:** Fueron cedidas por el grupo de Salud Porcina, Dpto. de Patología, FAyV, UNRC, quienes realizaron la toma de las muestras en granjas confinadas, con un tamaño aproximado entre 650 – 680 madres, ubicadas en las localidades de Salsipuedes y Baigorria, provincia de Córdoba.

Las muestras se tomaron del recto de animales en una etapa de desarrollo avanzada, es decir, en un rango de edad desde 4 hasta 22 semanas. Eran animales sanos a los cuales no se les administraban antibióticos que produjeran alteración de la flora intestinal. Considerando la edad de los animales y la ausencia de síntomas de cualquier tipo de enfermedad, no habría probabilidad de encontrar ETEC F4 en estas muestras.

El transporte hacia el laboratorio se realizó utilizando recipientes estériles refrigerados a 4 °C y se conservaron a esta temperatura hasta su utilización.

**Solución amortiguadora de fosfatos salina 10 mM pH 7 (SAFS):** Se preparó con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM,  $\text{NaCl}$  136,9 mM y  $\text{KCl}$  2,7 mM. Se utilizó para preparar las suspensiones de bacterias, diluir las muestras de materia fecal y como electrolito soporte en las experiencias electroquímicas.

**Nanotubos de Carbono:** Se emplearon NTCPM, marca Sigma, con diámetros de 110-170 nm y una longitud entre 8-9  $\mu\text{m}$ . Los NTCPM fueron activados previamente antes de ser utilizados. En primer lugar, se oxidaron en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HNO}_3$  (2:1), mediante calentamiento a ebullición bajo reflujo durante 10 horas. Así, se generan grupos carboxilo o hidroxilo en la superficie de los NTCPM favoreciendo su posterior dispersión en medio acuoso. Luego, se purificaron mediante centrifugado a 4000 rpm, se eliminó el sobrenadante y los NTCPM se enjuagaron con agua. Este procedimiento se repitió 3 veces. Finalmente, se realizó el dializado de la suspensión obtenida, empleando una membrana de diálisis de 100 KDa frente a agua destilada durante 3 días.

**Nafión:** Se utilizó una solución de resina de intercambio iónico de Nafión perfluorado al 5 % p/p, en una mezcla alcohol y agua, marca Aldrich.

**Filtros:** Se emplearon filtros de nylon de 25 mm de diámetro, marca Phenomenex, cuyo tamaño de poro es de 0,45  $\mu\text{m}$ .

**ET:** Como electrodo de trabajo, se empleó un electrodo de carbono vítreo de 3 mm de diámetro, modelo CHI104, CH Instruments. Antes de utilizarlo, se le realizó un pre-tratamiento que consistió en el pulido mecánico sobre un paño húmedo con alúmina 0,05  $\mu\text{m}$  y se sonicó 2 veces en intervalos de 1 minuto en agua destilada, a fin de retirar los restos de alúmina. Se enjuagó con abundante agua y se dejó secar para ser utilizado desnudo o para su posterior modificación.

**ER:** Se utilizó un electrodo de referencia Ag/AgCl, 3 M KCl, cuyo potencial es 0,197 V *vs* NHE.

**CE:** El contraelectrodo consistió en un alambre de Pt de gran área (aproximadamente 2  $\text{cm}^2$ ) enroscado en espiral.

**Celda electroquímica:** Se utilizaron dos celdas de vidrio convencionales (Capítulo 3, Figura 3.1, pág. 43), una de ellas para realizar los blancos y la otra para las suspensiones de bacterias. Ambas celdas están constituidas por dos cuerpos conectados por un capilar de área transversal pequeña. En el cuerpo principal se colocan el ET y CE, sujetos por una tapa de teflón y, en la otra parte, se coloca el ER.

#### **Equipos utilizados:**

Potenciostato PGSTAT 101, Metrohm Autolab (EcoChemie). El software de este equipo es el NOVA 1.7.

Estufas de esterilización e incubación: Se emplearon para esterilizar el material de vidrio (Placas de Petri, pipetas) a 160 °C durante 90 minutos y para la incubación del microorganismo.

Espectrofotómetro UV-Vis, Spectrum, modelo SP 2000.

Centrífuga G-electronic, modelo G-42.

Vórtex, Decalab SRL, modelo Eternity, 3500 rpm.

Limpiador Ultrasónico.

### 4.3. Metodología

#### 4.3.1. Preparación de stock de cultivo de ETEC F4

Se analizó la pureza de la cepa recibida mediante la observación de las colonias características de *E. coli* en medios selectivos y Tinción de Gram.

Para esto, se realizó la siembra en estrías por agotamiento sobre agar EMB. Luego de incubar las placas durante 24 horas a 37 °C, se seleccionó una de las colonias para realizar la Tinción de Gram. Se preparó un extendido tomando una parte de la colonia seleccionada y se colocó sobre una pequeña gota de agua en un portaobjetos limpio. La preparación se dejó secar, se fijó al portaobjetos mediante calor y, luego, se realizó la tinción, respetando los tiempos indicados por el fabricante.

La Tinción de Gram es una coloración diferencial que permite clasificar a las bacterias en base a las diferencias químicas y físicas de la pared celular. Los colorantes que se emplean son compuestos catiónicos que se unen a moléculas o superficies cargadas negativamente, como lo es la pared celular de las bacterias.

El primer colorante que se agrega es el violeta de genciana y es captado en la pared celular de todas las bacterias, formando un complejo insoluble al añadir el lugol. La mezcla alcohol/acetona que se añade posteriormente es utilizada como decolorante y produce un aumento en la permeabilidad de las bacterias Gram negativas, con lo cual liberan el complejo cristal violeta-lugol. Las paredes de las bacterias Gram positivas tratadas con alcohol sufren una deshidratación y sus poros se contraen, disminuyendo la permeabilidad e incrementando la retención del complejo cristal violeta-yodo. Finalmente, se agrega la safranina y las bacterias Gram negativas toman el color de este colorante de contraste, con lo cual se observan de color rosado, mientras que las Gram positivas retienen el color violeta. Luego de realizar la tinción, el frotis se observó en microscopio óptico con el lente objetivo 100X.

Una colonia pura se inoculó en 5 mL de CTS y se incubó en estufa a 37 °C. Luego de 18 horas de incubación, se observó el incremento de la turbidez del CTS, debido al crecimiento de las bacterias. En condiciones de esterilidad, se agregó el 30 % de glicerol, se homogeneizó y se distribuyó en viales de 2 mL para conservar la cepa a -20 °C.

El uso de aditivos crioprotectores, en este caso el glicerol, minimiza los efectos perjudiciales propios del proceso de congelamiento que podrían destruir a las células. Estos

efectos se relacionan, principalmente, con el aumento de concentración de soluto y la formación de cristales de hielo (intra o extracelulares, dependiendo de la velocidad de enfriamiento) debido a las diferencias en presión osmótica que se generan durante el proceso.

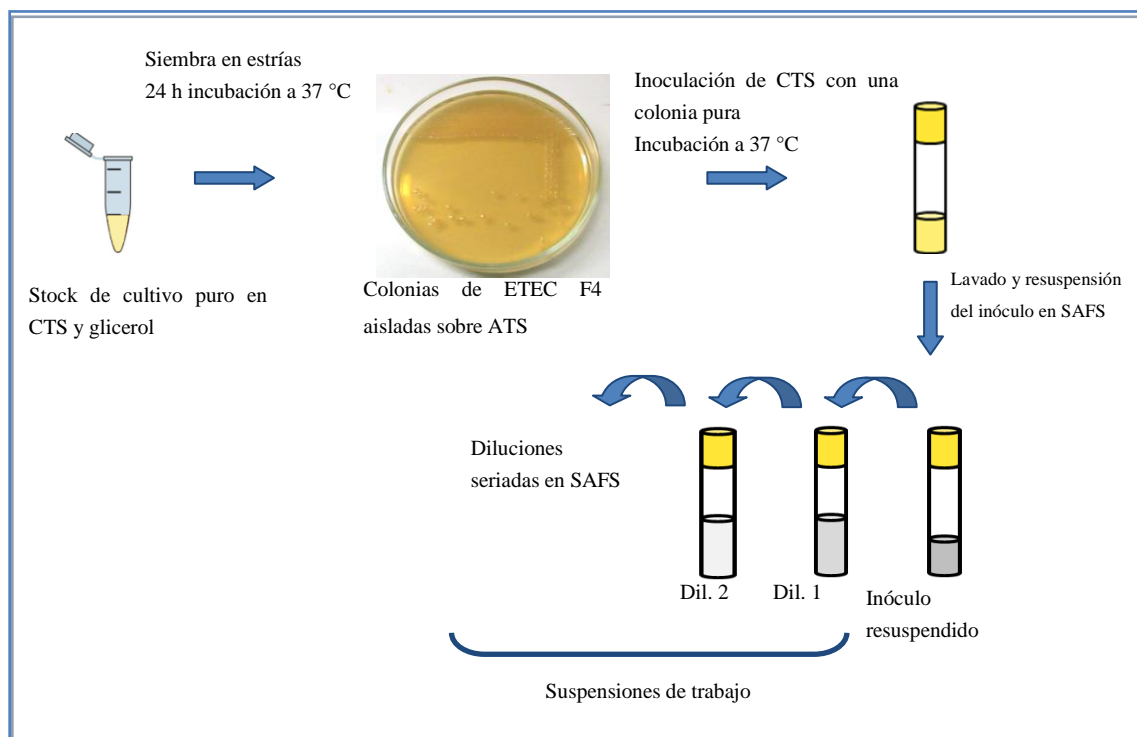
A partir de estos viales con la cepa congelada, se siembran al menos 2 placas con agar EMB, Mac Conkey o ATS. Una de las placas se utiliza para preparar un nuevo stock de bacterias, verificando previamente la pureza de la colonia seleccionada para inocular el CTS. Las demás placas se conservan en heladera aproximadamente durante 15 días y se utilizan para preparar las suspensiones de trabajo, y sólo se subcultivan una vez más.

La finalidad de este procedimiento de trabajo es asegurar, en lo posible, la conservación de la cepa y evitar riesgos de contaminación o mutaciones que podrían ocurrir al hacer repiques sucesivos [2]. Cuando los patógenos se mantienen en condiciones de cultivo de laboratorio y no son reproducidos en animales, los factores de virulencia pueden atenuarse [3].

### 4.3.2. Preparación de suspensiones de ETEC F4

A partir de los viales con la cepa ETEC F4, se sembraron placas con ATS y se incubaron durante 24 h a 37 °C para permitir el crecimiento de colonias aisladas del microorganismo. Las suspensiones de bacterias se prepararon inoculando un CTS de 5 mL con una de estas colonias aisladas e incubando a 37 °C durante distintos tiempos, según las experiencias a realizar. Posteriormente, el inóculo se lavó 3 veces y se resuspendió en SAFS, eliminando de esta manera todos los componentes del caldo de cultivo que podrían generar una señal electroquímica en la ventana de potencial en la cual se trabajó. A partir de este inóculo se realizaron diluciones sucesivas 1/10 en SAFS.

En la Figura 4.4 se representa el procedimiento utilizado para preparar las suspensiones de ETEC F4.



**Figura 4.4.** Procedimiento de preparación de suspensiones de ETEC F4

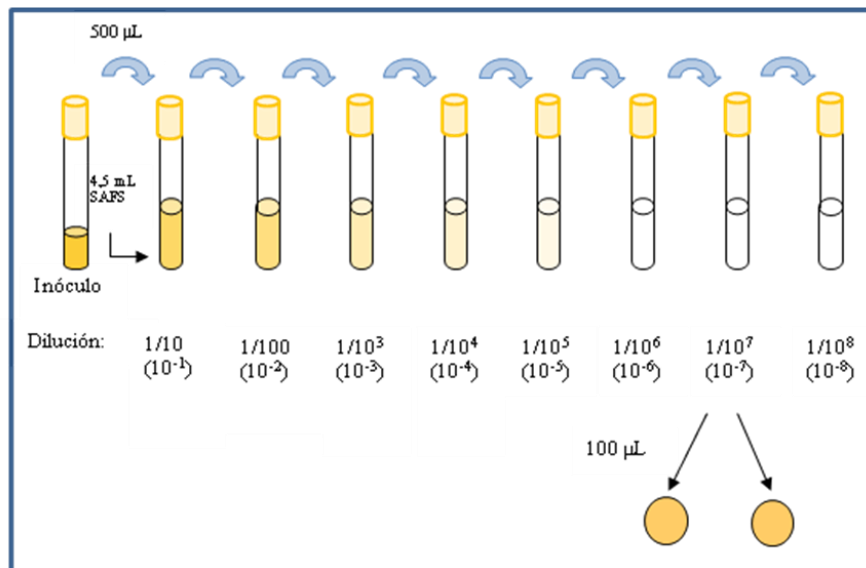
En las experiencias que se realizaron se utilizaron suspensiones de bacterias vivas y también suspensiones donde se realizó la lisis celular mediante un tratamiento por ultrasonido y un tratamiento térmico. El procedimiento de preparación de las suspensiones fue el mismo, excepto que para realizar la lisis celular las suspensiones de bacterias se colocaron en un baño ultrasónico o se inactivaron en autoclave durante 40 min a 121 °C.

#### 4.3.3. Determinación de la concentración de suspensiones de ETEC F4

La estimación del número de células presentes en las suspensiones de trabajo se realizó, en principio, mediante recuento en placa. Esta técnica permite la determinación de células microbianas viables, definidas como aquellas que son capaces de dividirse y dar lugar a una descendencia. Por lo tanto, forman colonias sobre medios de cultivo sólidos luego de un cierto tiempo de incubación [3].

Para aplicar esta técnica, en primer lugar se prepararon placas con ATS. Dichas placas se dejan sobre mesada, en posición invertida, durante aproximadamente 24 horas. De esta manera, se consigue un control de esterilidad observando que no haya ocurrido crecimiento debido a contaminantes presentes en el ambiente de trabajo del laboratorio.

Por otra parte, se inoculó un CTS de 2,5 mL con una de las colonias de ETEC F4 aisladas sobre medio sólido, y se llevó a estufa a 37 °C durante 18 horas. A partir de este inóculo, se realizaron diluciones seriadas (1/10) en SAFS, como se representa en la Figura 4.5.



**Figura 4.5.** Determinación de células viables mediante recuento en placas.

Se sembraron, por duplicado y utilizando la espátula de Drigalsky, 100 µL de las diluciones 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> sobre las placas preparadas anteriormente. Las placas sembradas se incuban en estufa, en posición invertida, durante 24 horas a 37 °C. Se contó el número de colonias presentes en cada una de ellas y, con el valor promediado se calculó el número de UFC mL<sup>-1</sup> presentes en el inóculo de la siguiente manera:

*Nº de células viables*

$$\text{presentes en el inóculo} = \text{Nº de colonias} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Factor de alícuota} \quad (\text{UFC mL}^{-1})$$

El factor de dilución es el inverso de la dilución (para la dilución 10<sup>-7</sup>, el factor de dilución será 10<sup>7</sup>) y el factor de alícuota en este caso es 10 (0,1<sup>-1</sup> mL).

La técnica de recuento en placa puede estar sujeta a errores [3]. Si bien una de las ventajas que presenta es la determinación de células viables, el procedimiento requiere múltiples pasos, lo cual se traduce en un mayor tiempo necesario para determinar las concentraciones de bacterias presentes en una suspensión.

Por otra parte, un método más rápido para obtener estimaciones del número de células es turbidimetría, y fue la técnica que se empleó en estas experiencias. Los valores de densidad óptica (DO) se relacionaron con el número de microorganismos a través de la escala de Mc Farland.

Los cultivos bacterianos actúan como suspensiones coloidales absorbiendo y dispersando la luz que incide sobre ellos, siendo la luz absorbida o dispersada directamente proporcional a la concentración de células en el cultivo. Por lo tanto, las medidas de turbidez utilizando un espectrofotómetro constituyen un procedimiento rápido y sencillo de estimar el número de bacterias en un cultivo.

La escala de Mc Farland representa concentraciones específicas de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>) y está diseñada para ser utilizada en la estimación de las concentraciones de bacterias Gram negativas, tales como *E. coli*.

Los estándares de Mc Farland se preparan añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario, con lo cual se obtiene una suspensión de sulfato de bario. El patrón 0,5 de Mc Farland corresponde a una suspensión homogénea de *E. coli* de  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Un valor aceptable medido espectrofotométricamente a 625 nm para dicho estándar es 0,08-1 [4].

En la Tabla 4.1 se presenta la composición de cada estándar de Mc Farland y su correlación con el número de UFC mL<sup>-1</sup>.

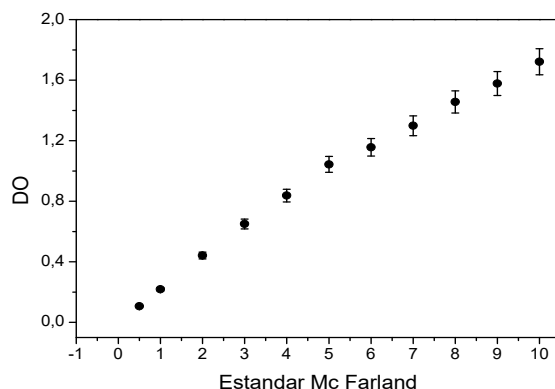
**Tabla 4.1.** Preparación e interpretación de la escala Mc Farland

Estándar	BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (μL) 1,175 %	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL) 1%	Equivalente en UFC mL <sup>-1</sup> (x10 <sup>8</sup> )
0	50	9,95	1,5
1	100	9,9	3
2	200	9,8	6
3	300	9,7	9
4	400	9,6	12
5	500	9,5	15
6	600	9,4	18
7	700	9,3	21
8	800	9,2	24
9	900	9,1	27



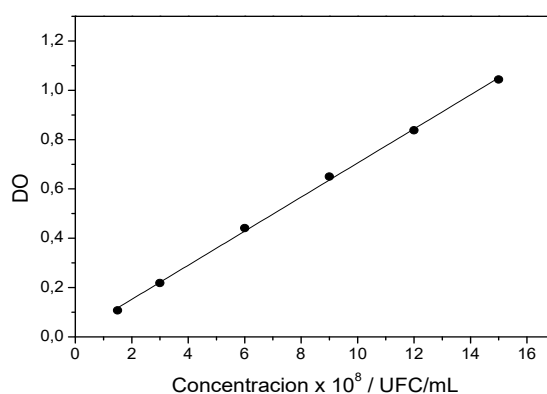
1	1000	9	30
---	------	---	----

Se prepararon los estándares de Mc Farland, tal como se describen en la Tabla 4.1, por triplicado y se midió la DO de cada uno de ellos a 625 nm (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** DO de los estándares de Mc Farland

La aproximación lineal se realizó con los valores de DO correspondientes a los estándares 0,5 a 5 inclusive, debido a que presentan menor error relativo porcentual que los demás estándares. Además, dentro de este intervalo se encuentran los valores de DO de las suspensiones de trabajo. En la Figura 4.7 se representa la aproximación lineal realizada en función de la concentración de bacterias, según lo indicado para los estándares de Mc Farland en la Tabla 4.1.



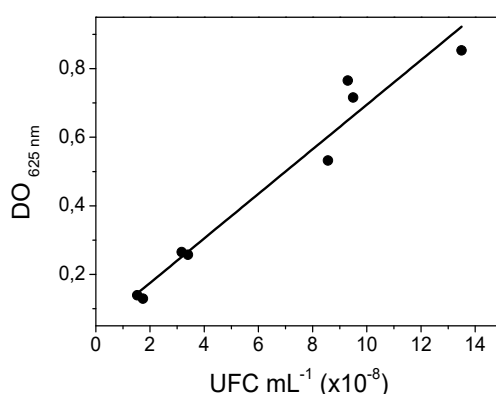
**Figura 4.7.** Aproximación lineal entre los valores de DO y el número de UFC mL<sup>-1</sup>

La ecuación que se obtuvo a partir de la regresión lineal de los valores de DO vs UFC mL<sup>-1</sup>, utilizando los estándares de Mc Farland, es la siguiente:

$$DO = (1,4 \pm 0,9) \times 10^{-2} + (6,9 \pm 0,1) \times 10^{-2} * c \quad r = 0,9994$$

donde DO representa al valor de densidad óptica de la suspensión y  $c$  es la concentración de bacterias ( $\times 10^8$ ) en UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

Por otra parte, se prepararon suspensiones de ETEC F4 en SAFS de distintas concentraciones, se midió la DO a 625 nm de cada una de ellas y, simultáneamente, se determinó su concentración mediante recuento en placa. Para esto, a partir de cada suspensión, se realizaron 6 ó 7 diluciones sucesivas 1/10, de las cuales se sembraron 100  $\mu\text{L}$  sobre tres placas con ATS. Las placas sembradas se incubaron en estufa durante 24 h a 37 °C y luego de contarse el número de colonias, se calculó la concentración teniendo en cuenta el factor alícuota y el factor de dilución. En la Figura 4.8 se muestra la correlación que se obtuvo experimentalmente entre los valores de DO vs UFC  $\text{mL}^{-1}$  para cada suspensión.



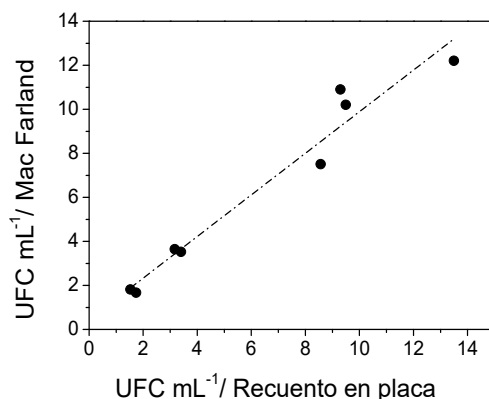
**Figura 4.8.** Correlación entre DO y el conteo en placa de suspensiones de ETEC F4.

En este caso, del análisis de regresión lineal, se obtuvo la siguiente ecuación a partir de la cual se puede calcular la concentración de las suspensiones de bacterias:

$$DO = (4,5 \pm 4,3) \times 10^{-2} + (6,5 \pm 0,6) \times 10^{-10} * c \quad r = 0,948$$

A modo comparativo, en la Figura 4.9 se grafican las concentraciones obtenidas experimentalmente por recuento en placa con respecto a los valores correspondientes a la

escala de Mac Farland. Mediante aproximación lineal, se obtuvo un valor de pendiente de 0,945, con lo cual se puede observar que los resultados del conteo realizado se aproximan bastante a los que se obtendrían utilizando la escala de Mac Farland.



**Figura 4.9.** Relación entre la escala de Mc Farland y conteo en placa

Así, en las experiencias realizadas posteriormente, la concentración de las suspensiones de ETEC F4 se estimó utilizando la correlación que se obtuvo experimentalmente entre los valores de DO y el recuento en placa.

#### 4.3.4. Preparación de muestras de materia fecal

La materia fecal es una matriz compleja y está compuesta principalmente por los restos de alimentos que no se metabolizaron y también por un gran número de bacterias que constituyen la microbiota intestinal [5]. La composición de esta microbiota es muy variable, dependiendo principalmente del huésped, su edad, estado de salud y alimentación, entre otros [6].

Actualmente, el procedimiento empleado para la preparación de las muestras de materia fecal es uno de los principales desafíos para la determinación de bacterias patógenas mediante PCR, debido a la presencia de sustancias que inhiben la actividad de la enzima polimerasa [7]. En el caso de las técnicas electroquímicas, cabe indicar que este tipo de inconvenientes no estaría presente. Sin embargo, teniendo en cuenta la superficie del sensor desarrollado, podrían presentarse algunas interferencias debido a la oxidación de compuestos en la ventana de potencial utilizada, cercanos al pico de oxidación de ETEC F4.

Hay gran cantidad de publicaciones recientes donde se proponen métodos para la determinación de la presencia de bacterias patógenas en muestras de materia fecal [8-11]. Sin embargo, no se dispone de bibliografía sobre la aplicación de técnicas voltamperométricas en dichas muestras. Por lo tanto, se realizaron experiencias preliminares para observar, de manera general, los efectos de esta matriz sobre la respuesta obtenida con el sensor bioelectroanalítico mediante VOC.

Las muestras se analizaron con la mayor brevedad posible luego de recibidas. De ser necesario, se conservaron en heladera a 4 °C para evitar un cambio significativo en la composición microbiana de la muestra [12].

Se preparó una suspensión semi-líquida con 1 g de materia fecal proveniente de un animal de 4 semanas de edad, en 5 mL de SAFS. Esta suspensión se homogeneizó utilizando un vórtex, se colocó en la celda electroquímica, se preconcentró mediante agitación magnética durante 10 min y se realizó la VOC.

Posteriormente, a fin de retirar material insoluble, a esta misma suspensión se le realizaron distintos procedimientos de centrifugado leve y así evitar la sedimentación de las bacterias presentes en la muestra, con velocidades entre 500 y 1000 rpm y durante 5 - 10 min. En este caso, las medidas electroquímicas se realizaron en el sobrenadante.

Si bien la muestra utilizada inicialmente era semi-líquida, el centrifugado fue indispensable para realizar las determinaciones en otras muestras que presentaban una gran cantidad de material sólido (restos de alimentos sin digerir, palos, arena, etc.) ya que, debido al diseño de la celda electroquímica, bloqueaban el capilar en contacto con el electrodo de referencia.

En base a las experiencias anteriores, se seleccionó el procedimiento de preparación de muestras que fuese más simple, rápido y que permitiera realizar adecuadamente las medidas electroquímicas.

De la misma manera, mediante VOC también se analizaron muestras que correspondían a animales de 16, 19 y 22 semanas para observar la variabilidad entre muestras provenientes de animales de distintas edades.

Finalmente, se observó la respuesta electroquímica de suspensiones de muestra más diluidas (1/50, 1/500 y 1/5000). A estas muestras se les realizó el proceso de centrifugado seleccionado y el sobrenadante se llevó al autoclave donde se mantuvo durante 40 min a 121 °C y en él se realizaron las medidas electroquímicas.

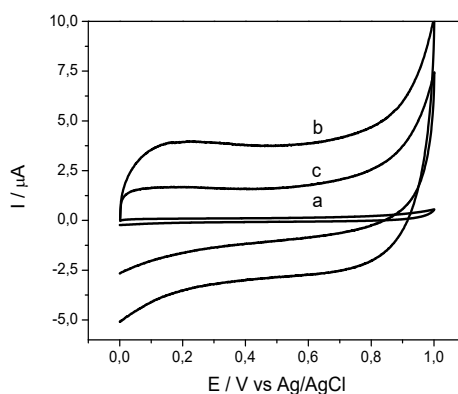
#### 4.3.5. Modificación de electrodos de trabajo

Se analizó la respuesta electroquímica de suspensiones de bacterias con electrodos de CV, CV/NTCPM y CV/NTCPM-Nafión. En los dos últimos casos, la concentración de NTCPM fue de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  y la dispersión se realizó por sonicado durante 30 min.

Para la modificación del electrodo, se colocaron  $20 \text{ }\mu\text{L}$  de la suspensión correspondiente sobre el electrodo pretratado y se dejó secar a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Luego se realizó la estabilización de la superficie del electrodo mediante voltamperometría cíclica a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  desde  $-0,2$  a  $+1 \text{ V}$  vs Ag/AgCl en SAFS.

En la Figura 4.10 se muestran los voltamperogramas obtenidos con los tres electrodos: a) CV desnudo, b) electrodo CV/NTCPM- Nafión y c) electrodo CV/NTCPM.

Se puede observar el incremento en la corriente capacitiva de los electrodos modificados con respecto al electrodo de carbono vítreo desnudo, debido principalmente al aumento del área electroactiva.

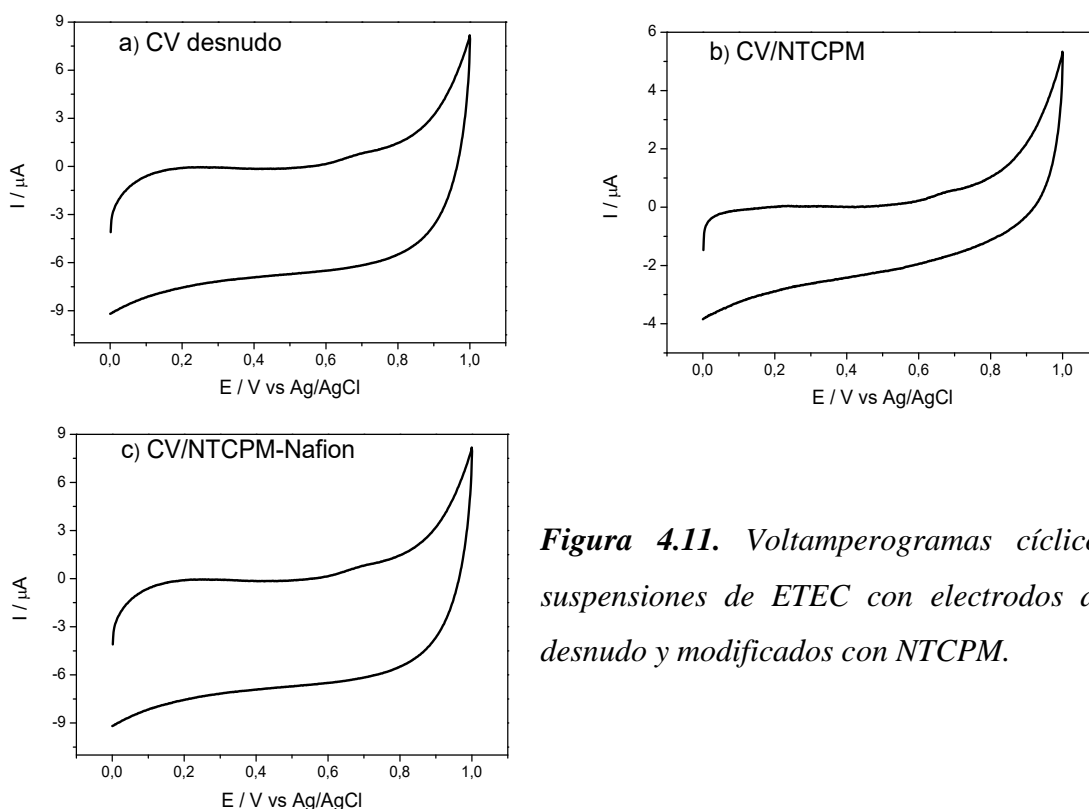


**Figura 4.10.** Voltamperogramas cíclicos en SAFS de electrodos a) carbono vítreo (CV) desnudo, b) CV modificado con NTCPM dispersos en agua y nafión y c) CV modificado con NTCPM dispersos en agua.

#### 4.4. Resultados y Discusión

##### 4.4.1. Comportamiento electroquímico de suspensiones de bacterias vivas

La respuesta electroquímica de suspensiones de ETEC F4 utilizando los tres electrodos, se analizó mediante voltamperometría cíclica en una ventana de potencial de 0 a 1 V y  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . En presencia de células ETEC F4 se observó un pico de oxidación irreversible (Figuras 4.11 a-c), cuyos  $E_p$  (V) e  $I_p$  ( $\mu\text{A}$ ) se presentan en la Tabla 4.2.



**Figura 4.11.** Voltamperogramas cíclicos de suspensiones de ETEC con electrodos de CV desnudo y modificados con NTCPM.

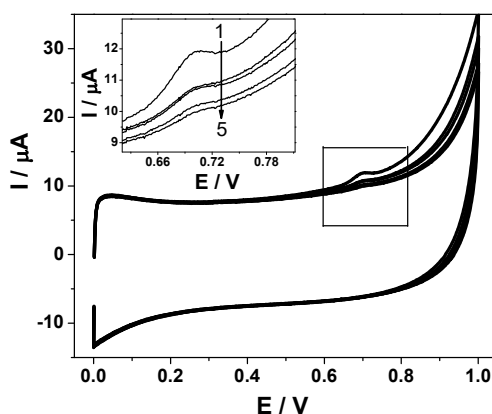
	$I_p$ ( $\mu\text{A}$ )	$E_p$ (V)
<b>Electrodo desnudo</b>	0,016	0,806
<b>Electrodo CV/NTCPM</b>	0,041	0,673
<b>Electrodo CV/NTCPM -Nafión</b>	0,073	0,691

**Tabla 4.2.** Respuestas electroquímicas de suspensiones ETEC F4 con electrodos de CV desnudo y modificados

Con los electrodos modificados, la corriente de pico que se obtuvo fue mayor con respecto a la del electrodo desnudo, desplazándose el pico a potenciales menores. En base

a esto puede decirse que los NTCPM catalizan la oxidación electroquímica de las especies electroactivas presentes en la suspensión de ETEC F4. Así, los estudios posteriores se realizaron sobre los electrodos modificados, utilizando particularmente el electrodo CV/NTCPM-Nafión.

Se realizaron voltamperogramas cíclicos consecutivos de una dilución de ETEC F4 en SAFS, utilizando el electrodo CV/NTCPM-Nafión (Figura 4.12). Se observó un pico de oxidación irreversible a 0,69 V cuya intensidad disminuye al realizar barridos sucesivos. Además, el  $E_p$  se desplazó ligeramente a potenciales más positivos. Este comportamiento sugiere la paulatina pasivación de la superficie del electrodo debido a la posible adherencia de las células de *E. Coli* y/o productos metabólicos generados por los microorganismos.



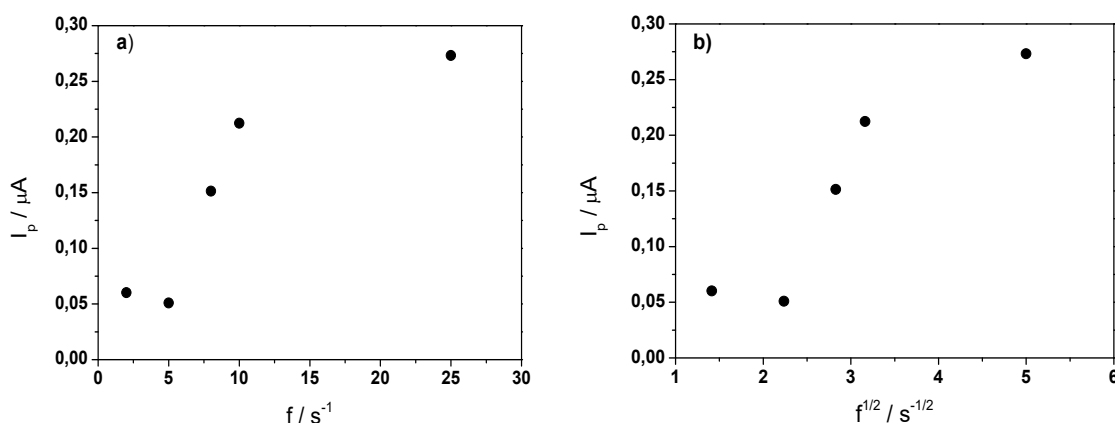
**Figura 4.12.** Voltamperogramas cíclicos consecutivos de suspensiones de bacterias ETEC F4

Cabe mencionar que la respuesta electroquímica de suspensiones de bacterias ha sido investigada en algunos trabajos recientes [13-15]. El origen de estas señales de corriente generadas no sólo por suspensiones de bacterias, sino también por levaduras e incluso células eucariotas [16,17], no ha sido definido con exactitud. En las células vivas ocurren, simultáneamente, una gran cantidad de procesos bioquímicos con características electroquímicas y las señales obtenidas, probablemente, derivan de varios procesos celulares, tales como transporte iónico, interacciones enzima/cofactor y producción de metabolitos [14,18]. Algunos autores sugieren que existe una interacción directa entre la pared celular de las bacterias y la superficie del electrodo [13], y, la presencia de fimbrias o pilis, facilita la transferencia de electrones, especialmente, cuando los aceptores son sustratos sólidos [19].

De manera general, los posibles mecanismos para explicar el comportamiento electroquímico de suspensiones de microorganismos incluyen: la producción de moléculas electroactivas solubles que se liberan al medio, el contacto directo entre la membrana externa de las células y el electrodo [20] y la participación de la cadena de transporte de electrones, relacionada con la respiración microbiana [21]. Sin embargo, el mecanismo de transferencia de electrones entre los microorganismos y el electrodo no ha sido completamente dilucidado [22] y puede variar de un microorganismo a otro.

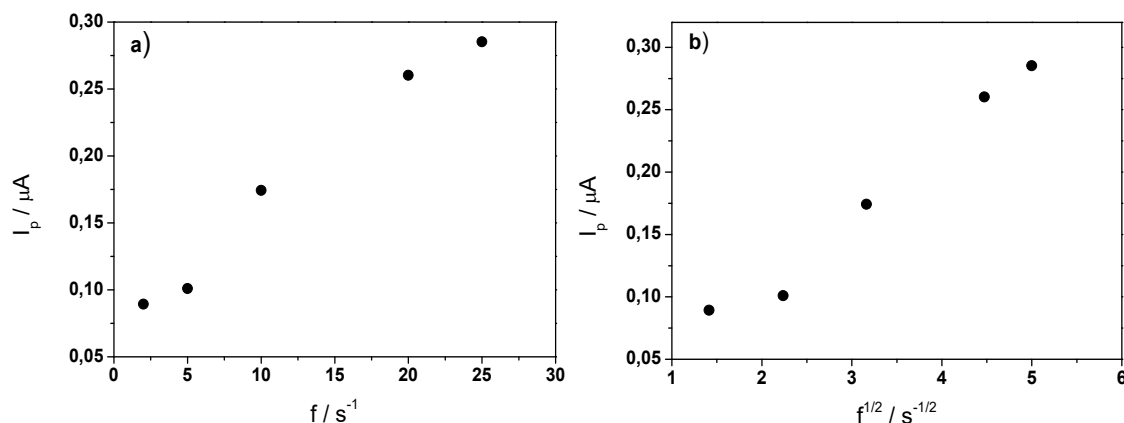
Considerando que no existen estudios sobre la respuesta electroquímica de ETEC F4, se realizaron las siguientes experiencias de VOC para conocer la importancia relativa de cada mecanismo de transferencia de electrones sobre la  $I_{p,n}$ . De esta manera, se busca optimizar las condiciones para la detección de la bacteria ETEC F4.

En primer lugar, se analizó la variación de la  $I_{p,n}$  con respecto a la frecuencia ( $f$ ) y  $f^{1/2}$ . Se utilizaron los electrodos modificados CV/NTCPM (Figura 4.13) y CV/NTCPM-Nafión (Figura 4.14) y una suspensión  $2,0 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de ETEC F4.



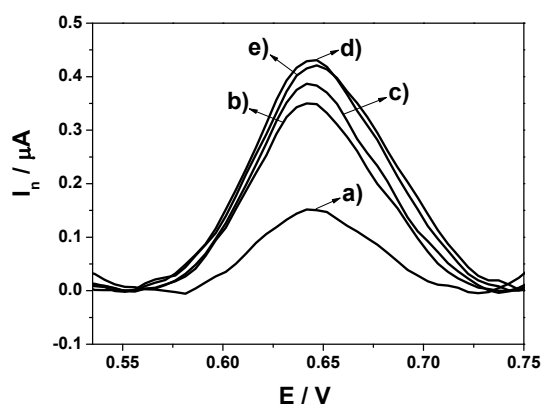
**Figura 4.13.** Variación de la  $I_{p,n}$  en función de la frecuencia ( $f$ ) y  $f^{1/2}$  con electrodos CV/NTCPM.





**Figura 4.14.** Variación de la  $I_p$  en función de la frecuencia ( $f$ ) y  $f^{1/2}$  con electrodos CV/NTCPM-Nafión.

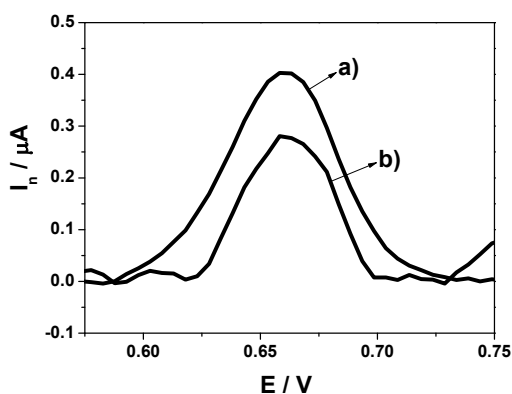
Si bien los resultados obtenidos con el electrodo CV/NTCPM-Nafión fueron más precisos, con ambos electrodos modificados se observó una variación sigmoideal de la  $I_{p,n}$  con respecto a la frecuencia, lo cual indica un comportamiento mixto adsorptivo-difusional [23]. Por lo tanto, se realizaron estudios de preconcentración en solución agitada con el electrodo CV/NTCPM-Nafión (Figura 4.15) y se observó que luego de 10 min de agitación la  $I_{p,n}$  tiende a alcanzar un estado estacionario.



**Figura 4.15.** Voltamperogramas de onda cuadrada de suspensión de ETEC F4 a distintos tiempos de preconcentración: a) 0; b) 2 min; c) 4 min; d) 8 min y e) 16 min.

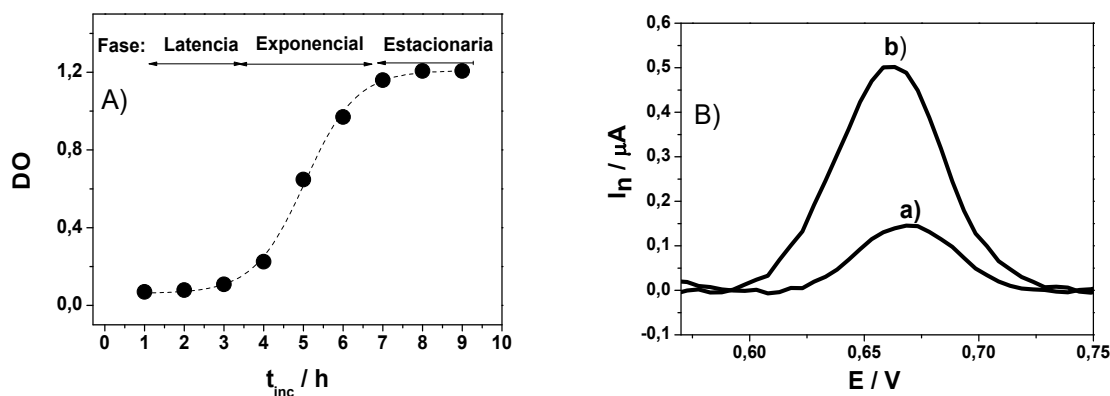
Por otra parte, se realizaron experiencias en presencia y ausencia de células. Para esto se preparó una suspensión de ETEC F4 en SAFS, se dividió en dos partes iguales y una de ellas se filtró. Cada una de estas suspensiones se colocó en la celda electroquímica y luego de 10 min de agitación se midieron por VOC. Como se muestra en la Figura 4.16,

en ambos casos se observó que la oxidación ocurrió a aproximadamente el mismo potencial. Por lo tanto, una de las componentes de la respuesta electroquímica de suspensiones de ETEC F4 estaría relacionada con la producción de sustancias endógenas, que son liberadas al medio en que se encuentran las bacterias. En presencia de bacterias, la respuesta electroquímica podría ser mayor debido a la transferencia directa entre los microorganismos y la superficie del electrodo.



**Figura 4.16.** Voltamperogramas de onda cuadrada de a) una suspensión de ETEC F4 y b) en ausencia de bacterias

El comportamiento observado en la Figura 4.16 podría verse afectado por la fase de crecimiento en que se encuentran las bacterias debido a los cambios en la permeabilidad de las membranas celulares en las distintas fases. Se realizó una curva de crecimiento (Figura 4.17A) y se analizó la respuesta electroquímica de diluciones de ETEC F4 preparadas a partir de inóculos en fase exponencial y estacionaria (Figura 4.17B).

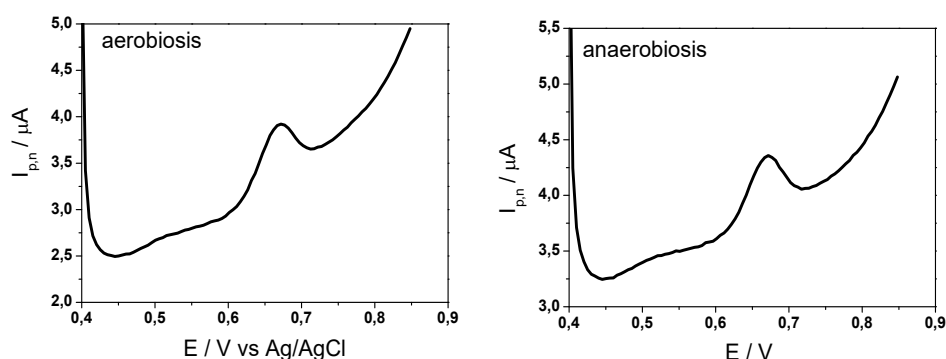


**Figura 4.17.** A) Curva de crecimiento de ETEC F4.  $t_{inc}$ : tiempo de incubación B) Corrientes netas obtenidos de suspensiones de ETEC F4 en a) Fase estacionaria y b) Fase exponencial.

La respuesta electroquímica de suspensiones de cultivos en fase exponencial fue mayor que en fase estacionaria. Este comportamiento puede deberse al aumento en la permeabilidad de las membranas celulares en cultivos en fase exponencial.

La misma experiencia se realizó también con suspensiones filtradas (en ausencia de células) y se observó igual tendencia aunque la intensidad de las corrientes fue menor que en presencia de células.

Se realizaron medidas en atmósferas de oxígeno y argón para analizar la influencia de la cadena de transporte de electrones, involucrados en la respiración microbiana, sobre la  $I_{p,n}$ . En la Figura 4.18 se presentan los voltamperogramas obtenidos y en la Tabla 4.3 los valores de  $I_{p,n}$  y  $E_p$  correspondientes.



**Figura 4.18.** Voltamperogramas de suspensiones de ETEC F4 en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis

**Tabla 4.3.** Valores de  $I_{p,n}$  y  $E_p$  obtenidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de suspensiones de bacterias vivas de ETEC F4

	UFC mL <sup>-1</sup>	$E_{p1}$ / V	$I_{p1}$ / μA	$E_{p2}$ / V	$I_{p2}$ / μA
<b>Aerobiosis</b>	$2,48 \times 10^8$	0,515	0,036	0,667	0,607
<b>Anaerobiosis</b>	$2,38 \times 10^8$	0,515	0,067	0,670	0,518

Como se puede observar en los voltamperogramas, además del pico de oxidación observado anteriormente, hay otro pico adicional a 0,515 V. Este comportamiento en determinaciones electroquímicas de *E.coli*, también ha sido mencionado por Chalenko y cols [14] en suspensiones de SAFS saturadas con argón. Sin embargo, los autores no sugieren una explicación posible a este comportamiento.

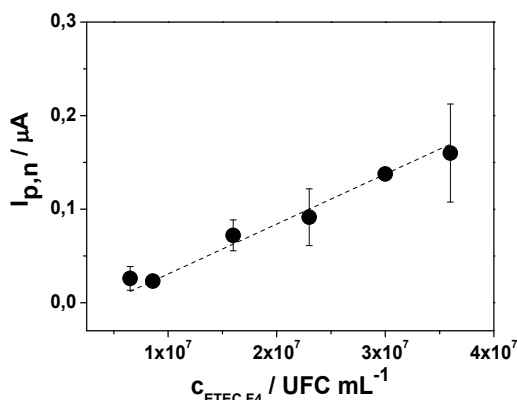
En cuanto a los datos obtenidos, la diferencia entre las  $I_{p,n}$  es muy pequeña en ambos casos. La variabilidad en la respuesta electroquímica de células vivas también ha sido observado por otros autores [24,25] y se mencionan, como posibles causas de esta

variabilidad, a las variaciones instrumentales y también los cambios en la actividad metabólica de los microorganismos. Por lo tanto, debido a que los resultados no son concluyentes para determinar si en las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis hay un efecto significativo sobre el valor de las  $I_{p,n}$ , dichas condiciones no se utilizaron para la cuantificación de ETEC F4.

De esta manera, se concluye que la respuesta electroquímica de ETEC F4 podría deberse a la producción de moléculas electroactivas endógenas y al contacto directo de la membrana celular externa y la superficie del electrodo en un proceso respiratorio aeróbico y/o aeróbico facultativo.

Finalmente, se analizó la relación entre la  $I_{p,n}$  y la concentración de suspensiones de bacterias en SAFS. En la Figura 4.19 se presenta la curva de calibrado que se obtuvo. Cada punto es un promedio de tres medidas experimentales.

Estas suspensiones se prepararon a partir de un cultivo en fase exponencial ( $t_{inc} = 6$  h) y con un tiempo de preconcentración de 10 min.



**Figura 4.19.** Curva de calibrado de suspensiones de bacterias vivas ETEC F4.

Se observó una relación lineal en el intervalo de concentraciones comprendido entre  $6 \times 10^6 - 3 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Del análisis de regresión se obtuvo una sensibilidad de  $(5,3 \pm 0,1) \times 10^{-9}$   $\mu\text{A mL UFC}^{-1}$ .

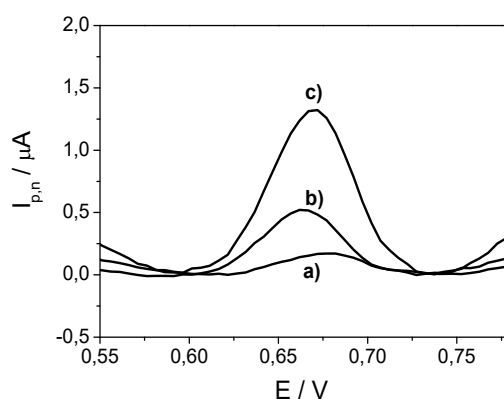
#### 4.4.2. Respuesta electroquímica de suspensiones de bacterias sometidas a lisis celular

Considerando que la permeabilidad de las membranas celulares condiciona la salida de sustancias electroactivas desde el interior de las células hacia el medio, afectando

en consecuencia la  $I_{p,n}$ , se analizó el comportamiento electroquímico de suspensiones de bacterias a las cuales se les realizó la lisis celular. Se realizó así un tratamiento térmico y por ultrasonido, a fin de conseguir la ruptura celular.

Para el tratamiento por ultrasonido, las suspensiones de bacterias se prepararon a partir de un cultivo de 6 h de incubación, se determinó su concentración y se colocaron en un baño ultrasónico durante 10, 20 y 30 min. Se analizó la efectividad del tratamiento aplicado mediante siembra en placas de las suspensiones sonicadas. Luego, se realizó la preconcentración y se determinó la respuesta electroquímica mediante VOC.

Como se muestra en la Figura 4.20, en los voltamperogramas de onda cuadrada de suspensiones de bacterias tratadas con ultrasonido, se observa el mismo pico de oxidación obtenido con las suspensiones de bacterias vivas.



**Figura 4.20.** Voltamperogramas de onda cuadrada de suspensiones de ETEC F4, luego de distintos tiempos de tratamiento con ultrasonido: a) 10 min, b) 20 min y c) 30 min.

**Tabla 4.4.**  $I_{p,n}$  y  $E_p$  en función del tiempo de sonicado de suspensiones de ETEC F4

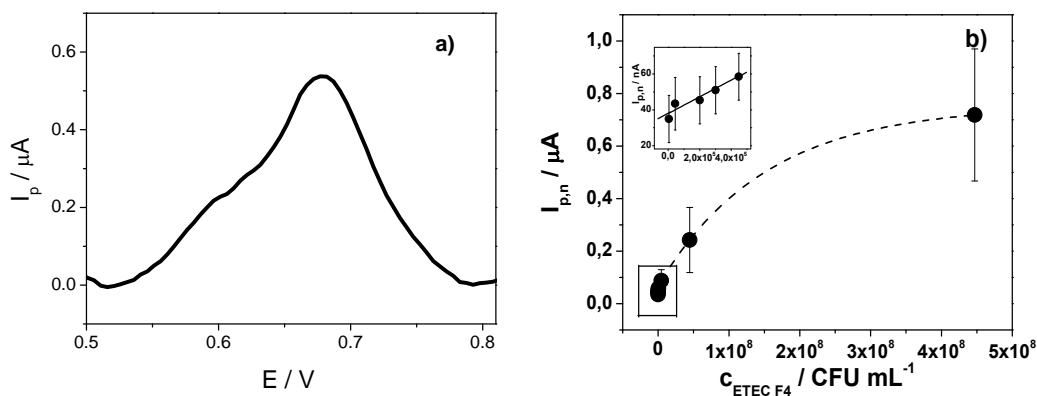
Tiempo / min	UFC mL <sup>-1</sup>	$E_p$ / V	$I_{p,n}$ / $\mu A$
10	$2,71 \times 10^8$	0,678	0,174
20	$2,08 \times 10^8$	0,664	0,525
30	$2,14 \times 10^8$	0,669	1,329

También se puede ver que la  $I_{p,n}$  aumenta con el tiempo durante el cual se aplica el ultrasonido. Es decir, la ruptura de las membranas celulares sería una forma de optimizar la respuesta electroquímica de las suspensiones de bacterias.

Sin embargo, el procedimiento empleado no fue efectivo en un 100 %. Mediante siembra en placa de todas las suspensiones de bacterias sonicadas, se pudo observar el crecimiento de colonias características de ETEC F4 (en menor proporción de lo que se obtendría si no se hubiera realizado el sonicado).

Por otra parte, la lisis celular mediante el tratamiento térmico se realizó utilizando un autoclave. Una vez preparadas las suspensiones de bacterias, se determinó su concentración inicial y se colocaron en el autoclave, donde se mantuvieron durante 40 min a 121 °C. En este proceso (comúnmente empleado para la inactivación de microorganismos), no sólo se rompen las membranas celulares, sino que también se desnaturalizan las distintas proteínas, lo cual conduce a la muerte del microorganismo. Posteriormente, las suspensiones se colocaron en la celda electroquímica, se realizó la preconcentración durante 10 min y se midió por VOC.

En la Figura 4.21a se puede ver que la respuesta electroquímica de suspensiones inactivadas de ETEC F4 presenta un  $E_p$  similar al de suspensiones de bacterias vivas, pero con una  $I_{p,n}$  mayor y un pequeño hombro antes del pico principal.



**Figura 4.21.a)** Corriente neta de suspensiones inactivadas de ETEC F4; **b)** Curva de calibrado de suspensiones ETEC F4.

Estos resultados demuestran que, a diferencia de otros microorganismos [15,26-28], la señal electroquímica de ETEC F4 podría no ser exclusiva de células vivas. En la Figura 4.21b se muestra la curva de calibrado que se obtuvo con suspensiones inactivadas. La variación de la  $I_{p,n}$  con la concentración de ETEC F4 es típica de sistemas adsorbidos, donde se alcanza la saturación para altas concentraciones de analito [29]. Considerando la porción lineal del gráfico, la regresión lineal ( $n = 15$ ) está dada por la ecuación:

$$I_{p,n} = (3,3 \pm 0,9) \times 10^{-2} [\mu A] + (4,1 \pm 1,4) \times 10^{-8} c_{\text{ETEC F4}} [\mu A \text{ mL UFC}^{-1}] \quad r = 0,9180$$

La sensibilidad fue  $(4,1 \pm 1,4) \times 10^{-8} \mu A \text{ mL UFC}^{-1}$ , es decir, un orden mayor que en el caso de suspensiones de bacterias vivas. La liberación de metabolitos electroactivos, presentes en el interior de las bacterias, mediante el tratamiento térmico de inactivación podría explicar este comportamiento.

Para calcular el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) se utilizaron las siguientes expresiones [30]:

$$LD = \frac{3,3S_{y/x}}{m} \sqrt{\left(1 + h_0 + \frac{1}{I}\right)}$$

$$LC = 3.03LD$$

Donde  $m$  es la pendiente de la curva de calibrado,  $I$  es el número de muestras para la calibración y  $S_{y/x}$  es la desviación estándar residual.  $h_0$  representa la diferencia desde la concentración media en el conjunto de calibración con respecto al intervalo implementado (*leverage*).

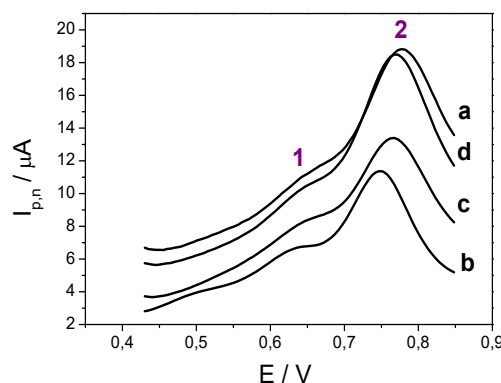
$$h_0 = \frac{\bar{c}_{cal}^2}{\sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c}_{cal})^2}$$

$\bar{c}_{cal}$  es el promedio de las concentraciones de la calibración y  $c_i$  es cada uno de los valores de concentración.

Los valores obtenidos fueron:  $LD = 6,2 \times 10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$  y  $LC = 1,9 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ .

#### 4.4.3. Determinaciones electroquímicas en muestras de materia fecal porcina

En la Figura 4.22 y Tabla 4.5 se presentan los voltamperogramas de onda cuadrada y sus correspondientes valores de  $E_p$  e  $I_{p,n}$ , que se obtuvieron con 4 procedimientos de preparación de muestras. Estos procedimientos se diferencian por las condiciones de centrifugado. La muestra de materia fecal corresponde a un animal de 4 semanas de edad.



**Figura 4.22.** Voltamperogramas de onda cuadrada de una muestra de materia fecal porcina bajo distintos procedimientos de preparación: a) Homogeneización mediante vórtex, b) 10 min de centrifugado a 500 rpm, c) 5 min de centrifugado a 1000 rpm y d) 10 min de centrifugado a 1000 rpm.

**Tabla 4.5.** Resultados de distintos procedimientos de preparación de muestras de materia fecal porcina.

Procedimiento	Ep <sub>1</sub> / V	Ip <sub>1</sub> / μA	Ep <sub>2</sub> / V	Ip <sub>2</sub> / μA
<b>a.</b> Homogeneización mediante vórtex	0,641	0,289	0,780	5,638
<b>b.</b> Centrifugado durante 10 min a 500 rpm	0,624	0,454	0,747	4,468
<b>c.</b> Centrifugado durante 5 min a 1000 rpm	0,637	0,365	0,767	4,400
<b>d.</b> Centrifugado durante 10 min a 1000 rpm	0,639	0,325	0,769	5,956

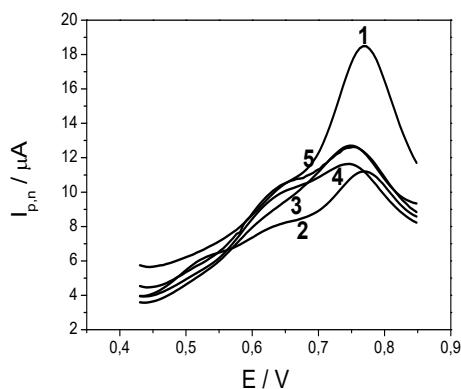
No se observó una relación directa entre las condiciones de centrifugado y los valores de  $I_{p,n}$ . Además, dada la complejidad de la matriz, resulta difícil asignar cada pico a la descarga de algún compuesto en particular.

Por lo tanto, con vista a eliminar posibles interferentes en la detección de ETEC F4 mediante la disminución de la altura de estos picos, no se lograrían diferencias entre estos procedimientos siendo la homogeneización mediante vórtex el más conveniente por su simplicidad. Sin embargo, para realizar las medidas en otras muestras con mayor cantidad de material sólido fue necesario realizar una separación inicial por centrifugado. En base a esto, se decidió aplicar un procedimiento de 10 min de centrifugado a 500 rpm que permitió obtener un sobrenadante más limpio para realizar las medidas.

Se analizaron otras muestras correspondientes a animales de distintas edades aplicando el procedimiento anterior, a fin de comparar las diferencias entre matrices. En la



Figura 4.23 se muestran los voltamperogramas de muestras de materia fecal de animales de 4, 16, 19 y 22 semanas (22 semanas A y 22 semanas B corresponden a dos animales de la misma edad) y en la Tabla 4.6 se presentan los parámetros característicos de los picos de oxidación principales.



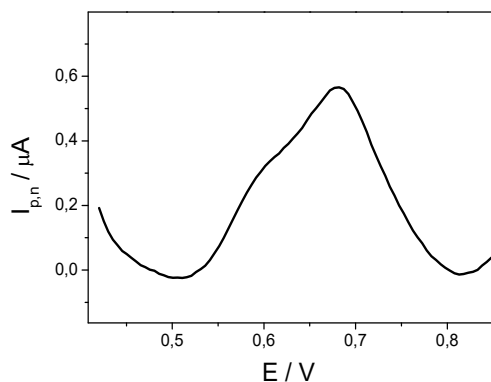
**Figura 4.23** Voltamperogramas de onda cuadrada de muestras de materia fecal porcina de animales de distintas edades: 1) 4 semanas, 2) 16 semanas, 3) 19 semanas, 4) 22 semanas A y 5) 22 semanas B.

**Tabla 4.6.** Valores de  $I_{p,n}$  y  $E_p$  observados en voltamperogramas de onda cuadrada de muestras de materia fecal porcina de animales de distintas edades

Semanas de edad	$E_{p1}$ / V	$I_{p1}$ / $\mu A$	$E_{p2}$ / V	$I_{p2}$ / $\mu A$
4	0,639	0,325	0,769	7,401
16	0,624	0,324	0,769	2,605
19	0,603	0,286	0,748	3,226
22 A	0,628	1,103	0,753	2,016
22 B	0,628	1,046	0,753	1,738

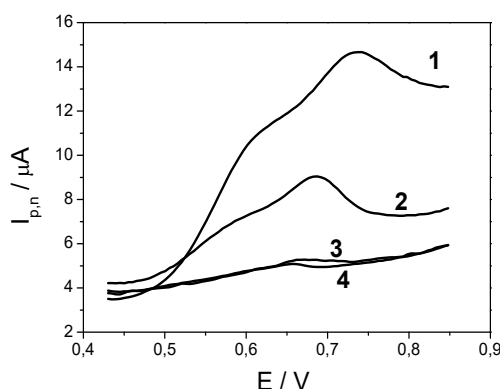
Independientemente de la edad del animal, se puede ver que en todas las muestras analizadas continúan apareciendo dos picos de oxidación principales, a los mismos potenciales. Esto sugiere que el comportamiento electroquímico de esta matriz sería independiente de la alimentación, variaciones en la microflora intestinal y de otros factores relacionados con la edad de los animales, lo cual es favorable para la aplicación de técnicas electroquímicas en estas matrices biológicas.

Además, puede observarse que estos dos picos de oxidación aparecen a potenciales próximos al de oxidación de ETEC F4, como se muestra en la Figura 4.24, afectando ligeramente la respuesta.



**Figura 4.24.** Voltamperograma de onda cuadrada típico de suspensión de ETEC F4 en SAFS.

Por otra parte, para realizar la cuantificación de ETEC F4 en muestras se consideró el mismo procedimiento de inactivación realizado a las suspensiones de bacterias en los estudios iniciales. Así, se preparó una suspensión de 1 g de materia fecal en 5 mL de SAFS, se centrifugó durante 10 min a 500 rpm y el sobrenadante se inactivó en autoclave 40 min a 121 °C. A partir de este sobrenadante inactivado se realizaron diluciones sucesivas 1/50, 1/500 y 1/5000, y se tomaron los voltamperogramas que se presentan en la Figura 4.25.

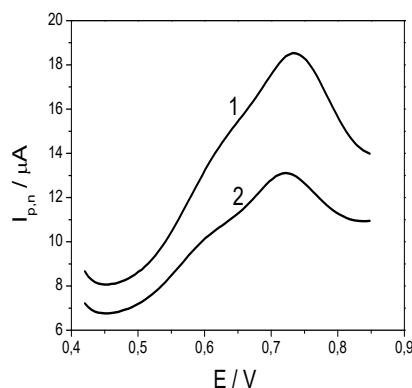


**Figura 4.25.** Voltamperogramas de onda cuadrada de distintas diluciones de materia fecal porcina en SAFS: 1) 1/5, 2) 1/50, 3) 1/500 y 4) 1/5000.

En base a la Figura 4.25 se puede observar que la respuesta electroquímica de muestras a las que se les aplicó el tratamiento térmico en autoclave es similar a la de muestras sin inactivar.

Como era de esperarse, los dos picos de oxidación principales disminuyen notablemente su intensidad a medida que aumentan las diluciones.

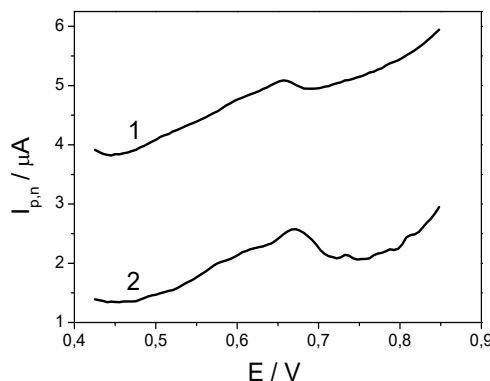
Se realizaron agregados sucesivos de distintos volúmenes de suspensiones puras de ETEC a muestras de materia fecal porcina diluidas 1/5 y 1/5000.



**Figura 4.26.** Voltamperogramas de onda cuadrada de muestra de materia fecal porcina: 1) diluida 1/5 en SAFS y 2) muestra diluida 1/5 con el agregado de suspensión de ETEC F4 a una concentración  $4,20 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

En el primer caso, como se puede ver en la Figura 4.26, no se pudo detectar la presencia de ETEC, incluso a una concentración relativamente alta de  $4,20 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> debido a que la señal de la matriz enmascara a la señal electroquímica de las bacterias.

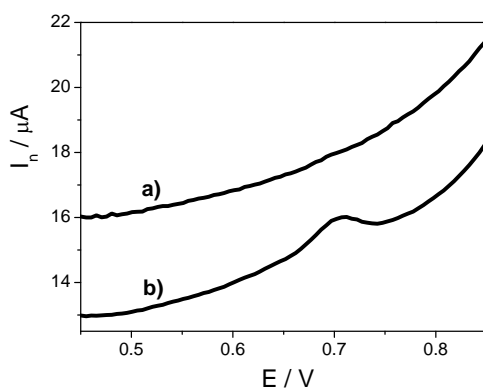
Sin embargo, cuando se realizaron las experiencias con la muestra de materia fecal diluida 1/5000 se pudo visualizar una diferencia en las corrientes de oxidación debido al agregado de suspensiones de ETEC F4. En la Figura 4.27 se presentan los voltamperogramas de la muestra diluida 1/5000, donde se puede visualizar un pico de oxidación a  $E_p = 0,656$  V con una  $I_{p,n} = 0,197$  μA, y el voltamperograma de la misma muestra diluida, pero con una concentración de ETEC F4 de  $2,00 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. En este caso, el pico de oxidación se encuentra a un  $E_p = 0,670$  V y la intensidad de la corriente es  $I_{p,n} = 0,335$  μA.



**Figura 4.27.** Voltamperogramas de muestra de materia fecal porcina: 1) diluida 1/5000 en SAFS y 2) muestra diluida 1/5000 con el agregado de suspensiones de ETEC F4 a una concentración  $2,00 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 4.4.4. Método de adiciones estándar en muestras de materia fecal porcina

En la Figura 4.28 se presentan los voltamperogramas de la muestra de materia fecal diluida 1/5000 y el voltamperograma de la misma muestra diluida, pero con el agregado de ETEC F4 en una concentración  $2,00 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Utilizando esta dilución para las muestras se minimizan los efectos de matriz y también se observa claramente un incremento en la  $I_{p,n}$  en presencia de la bacteria.



**Figura 4.28.** Corriente neta de a) muestra de materia fecal porcina diluida 1/5000 en SAFS, b) muestra diluida 1/5000 con el agregado de  $2,00 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de ETEC F4.

Por lo tanto, la determinación de ETEC F4 en muestras se realizó usando el método de adiciones estándar. Mediante VOC se pudo observar que la  $I_{p,n}$  aumenta con la

concentración de ETEC F4 en el intervalo de concentraciones comprendido entre  $2 \times 10^4$  –  $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Se realizaron experiencias por triplicado y de la porción inicial lineal ( $2 \times 10^4$  –  $8 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>,  $r = 0,9980$ ) se obtuvo una desviación relativa estándar de aproximadamente el 20 %. La sensibilidad fue  $(8,08 \pm 0,09) \times 10^{-8}$   $\mu$ A mL UFC<sup>-1</sup>, el LD =  $6 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> y LC =  $2 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### 4.5. Conclusiones

Se desarrolló un sensor electroquímico para detectar y cuantificar la bacteria *Escherichia coli* F4 (K88) en materia fecal porcina. Este sensor consiste en un electrodo de carbono vítreo modificado con una dispersión de nanotubos de carbono de pared múltiple dispersos en agua y nafión al 1%. La detección de ETEC F4 se realizó mediante voltamperometría de onda cuadrada, donde se pudo observar un pico de oxidación irreversible. Este comportamiento se presentó en suspensiones de bacterias vivas y también inactivadas por lisis térmica. En este último caso la señal fue mayor, debido posiblemente a la presencia de compuestos electroactivos de la bacteria liberados durante el pretratamiento térmico.

La metodología es rápida, precisa, económica y podría utilizarse para monitorear la presencia de ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina. Si bien el sensor no es selectivo, las posibles interferencias en la señal debido a la presencia de otras bacterias, moléculas y/o macromoléculas que participan en mecanismos celulares tales como citocromos a, b y c, ubiquinonas y menaquinonas, NADH, succinato, etc. son despreciables cuando la muestra de materia fecal se diluye 1/5000. De esta manera, la determinación de ETEC F4 se puede realizar utilizando el método de adiciones estándar.

En comparación a otros métodos para la cuantificación de ETEC F4 [31-34], este sensor presenta un límite de detección más alto que los inmunoensayos fluorescentes, pero cercano a los límites de las técnicas de PCR. Además, presenta como ventajas un tiempo de análisis más corto, costo accesible, fácil manipulación y no requiere el aislamiento previo de la bacteria en un medio de cultivo selectivo. Por otra parte, el pre-tratamiento que se requiere para la muestra es muy simple. Así, el dispositivo tiene un gran potencial para ser utilizado como herramienta de monitoreo y determinar posibles puntos de infección en cortos tiempos.

### Referencias

- (1) Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- (2) Collection, A. A. T. C.: Cryopreservation Technical Manual. [http://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation\\_Technical\\_Manual.ashx](http://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx), 2009.
- (3) Madigan, M. T., Martinko, J.M, Parker, J. Brock.: *Biología de los Microorganismos.*; 10 ed. Ed. Pearson Educación, 2003.
- (4) Murray, P. R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H.: *Manual of clinical microbiology*; 8 ed., 2003.
- (5) Roug, A., Byrne, B.A., Conrad, P.A., Miller, W.A.: Zoonotic fecal pathogens and antimicrobial resistance in county fair animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 36, 303-308.
- (6) Kim, H. B., Borewicz, K., White, B.A., Singer, R.S., Sreevatsan, S., Tu, Z.J., Isaacson, R.E.: Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet. Microbiol.* 2011, 153, 124-133.
- (7) Conrad, C. C., Stanford, K., McAllister, T.A., Thomas, J., Reuter, T.: Further development of sample preparation and detection methods for O157 and the top 6 non-O157 STEC serogroups in cattle feces. *J. Microbiol. Methods* 2014, 105, 22-30.
- (8) Bessède, E., Delcamp, A., Sifré, E., Buissonnière, A., Mégraud, F.: New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49, 941-944.
- (9) Narváez, C., Carruyo, G., Moreno, M., Rodas, A., Hoet, A., Wittum, T.: Aislamiento de *Escherichia coli* O157: H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Rev. Cient.* 2007, 17, 239-45.
- (10) Chehter, E. Z., Bacci, M.R., Fonseca, F.L., Gonçalves, J.A.C., Buchalla, G., Shiraichi, S.A.R., Mariano, R.C.: Diagnosis of the infection by the *Helicobacter pylori* through stool examination: method standardization in adults. *Clin. Biochem.* 2013, 46, 1622-1624.

- (11) Guy, R. A., Tremblay, D., Beausoleil, L., Harel, J., Champagne, M.J.: Quantification of *E. coli* O157 and STEC in feces of farm animals using direct multiplex real time PCR (qPCR) and a modified most probable number assay comprised of immunomagnetic bead separation and qPCR detection. *J. Microbiol. Methods* 2014, 99, 44-53.
- (12) Ott, S. J., Musfeldt, M., Timmis, K.N., Hampe, J., Wenderoth, D.F., Schreiber, S.: In vitro alterations of intestinal bacterial microbiota in fecal samples during storage. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, 50, 237-245.
- (13) Berrettoni, M., Carpani, I., Corradini, N., Conti, P., Fumarola, G., Legnani, G., Lanteri, S., Marassi, R., Tonelli, D.: Coupling chemometrics and electrochemical-based sensor for detection of bacterial population. *Anal. Chim. Acta* 2004, 509, 95-101.
- (14) Chalenko, Y., Shumyantseva, V., Ermolaeva, S., Archakov, A.: Electrochemistry of *Escherichia coli* JM109: Direct electron transfer and antibiotic resistance. *Biosens. Bioelectron.* 2012, 32, 219-223.
- (15) Xiao, X., Zhu, G., Liao, L., Liu, B., Yuan, Y., Wang, Y., He, J., He, B., Wu, Y.: A square wave voltammetric method for the detection of microorganism populations using a MWNT-modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta* 2012, 74, 105-110.
- (16) El-Said, W. A., Yea, C.-H., Kim, H., Oh, B.K., Choi, J.W.: Cell-based chip for the detection of anticancer effect on HeLa cells using cyclic voltammetry. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 1259-1265.
- (17) Rodríguez, J., Ramírez, A.S., Suárez, M.F., Soto, C.Y.: Electrochemical monitoring of the metabolic activity of mycobacteria in culture. *Anton. Leeuw.* 2012, 102, 193-201.
- (18) Ci, Y. X., Feng, J., Jiang, Z., Luo, D.: The voltammetric behavior of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectroch. Bioener.* 1997, 43, 293-296.
- (19) Chang, J.-L., Lien, C.-H., Vijayakumar, P.S., Hsieh, P.-H., Zen, J.-M.: Electrochemical regulation of microbial growth on disposable screen printed carbon electrodes. *Electrochim. Acta* 2012, 82, 103-108.

- (20) Lovley, D. R.: Electromicrobiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 2012, 66, 391-409.
- (21) Hassan, R. Y. A., Bilitewski, U.: Direct electrochemical determination of *Candida albicans* activity. *Biosens. Bioelectron.* 2013, 49, 192-198.
- (22) Zhang, Y.-C.; Jiang, Z.-H.; Ying, L.: Application of electrochemically active bacteria as anodic biocatalyst in microbial fuel cells. *Chinese J. Anal. Chem.* 2015, 43, 155-163.
- (23) Osteryoung, J., Odea, J.J.: Square-wave voltammetry. *Electroanal. Chem.* 1986, 14, 209-308.
- (24) Carpani, I., Conti, P., Lanteri, S., Legnani, P.P., Leoni, E., Tonelli, D.: Direct quantification of test bacteria in synthetic water-polluted samples by square wave voltammetry and chemometric methods. *Biosens. Bioelectron.* 2008, 23, 959-964.
- (25) Settrington, E. B., Alocilja, E.C.: Rapid electrochemical detection of polyaniline-labeled *Escherichia coli* O157: H7. *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 2208-2214.
- (26) Subrahmanyam, S., Shanmugam, K., Madhav, V.M., Murugesan, M., Subramanian, T.V., Jeyakumar, D.: Voltammetric studies of *Aspergillus niger*. Assessment of their growth using electroactive extracellular production of metabolite. *Electroanal.* 2001, 13.
- (27) Han, S., Li, X., Guo, G., Sun, Y., Yuan, Z.: Voltammetric measurement of microorganism populations. *Anal. Chim. Acta* 2000, 405, 115-121.
- (28) Kuznetsov, B. A., Khlopova, M.T., Shleev, S.V., Kaprelyants, A.S., Yaropolov, A.I.: An electrochemical method for measuring metabolic activity and counting cells. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2006, 42, 525-533.
- (29) Wang, J.: *Analytical Electrochemistry*; 3rd ed.: J. Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.
- (30) Olivieri, A. C.: Practical guidelines for reporting results in single-and multi-component analytical calibration: a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 2015, 868, 10-22.



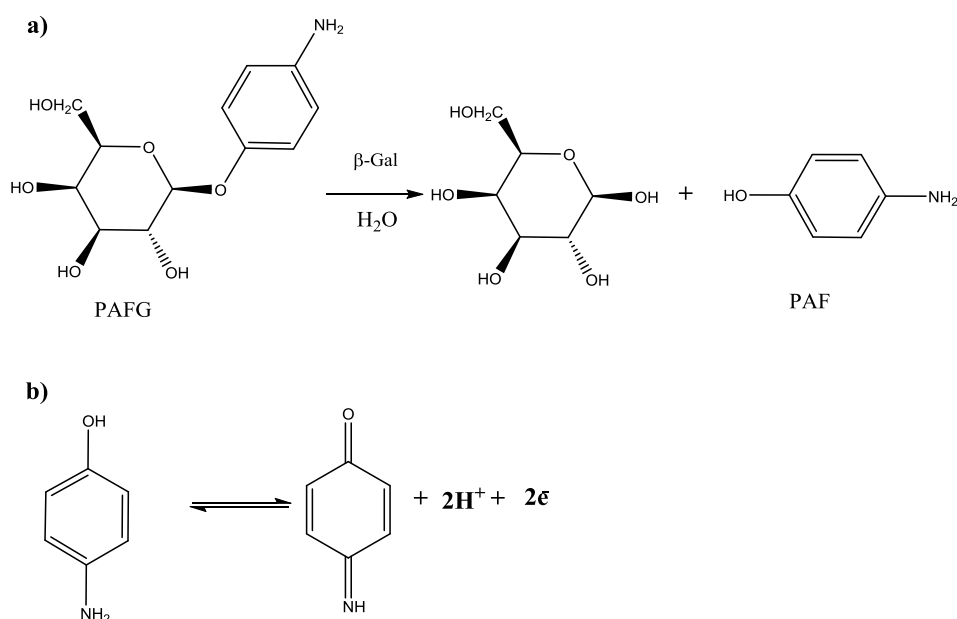
- (31) West, D. M., Sprigings, K.A., Cassar, C., Wakeley, P.R., Sawyer, J., Davies, R.H.: Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan® PCR assays. *Vet. Microbiol.* 2007, 122, 323-331.
- (32) Peng, Z., Ling, M., Ning, Y., Deng, L.: Rapid fluorescent detection of *Escherichia coli* K88 based on DNA aptamer library as direct and specific reporter combined with immuno-magnetic separation. *J. Fluoresc.* 2014, 24, 1159-1168.
- (33) Byun, J. W., Jung, B.Y., Kim, H.Y., Fairbrother, J.M., Lee, W.K.: Real-time PCR for differentiation of F4 (K88) variants (F4ab, F4ac, F4ad) of enterotoxigenic *Escherichia coli* from diarrhoeic piglets. *Vet. J.* 2012, 193, 593-594.
- (34) Ling, M., Peng, Z., Cheng, L., Deng, L.: Rapid fluorescent detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 based on graphene oxide-dependent nanoquencher and klenow fragment-triggered target cyclic amplification. *Appl. Spectrosc.* 2015, 69, 1175-1181.

## CAPITULO 5. MAGNETO-INMUNOSENSOR ELECTROQUIMICO

## 5.1. Consideraciones generales

En este capítulo se describe el magneto-inmunosensor electroquímico que se desarrolló para la detección y cuantificación de la bacteria ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina.

El principio de detección de este dispositivo se basó en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), una enzima intracelular que las bacterias utilizan para su crecimiento heterotrófico. Esta enzima cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos. En presencia de lactosa, *E. coli* produce  $\beta$ -gal para hidrolizar el disacárido en galactosa y glucosa. También, la  $\beta$ -gal puede hidrolizar otros sustratos como el p-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (PAFG), a pH neutro o ligeramente ácidos [1]. Esta enzima actúa mediante una reacción de hidrólisis, como se muestra en la Figura 5.1, donde se genera el p-aminofenol (PAF), el que es susceptible de oxidarse electroquímicamente:

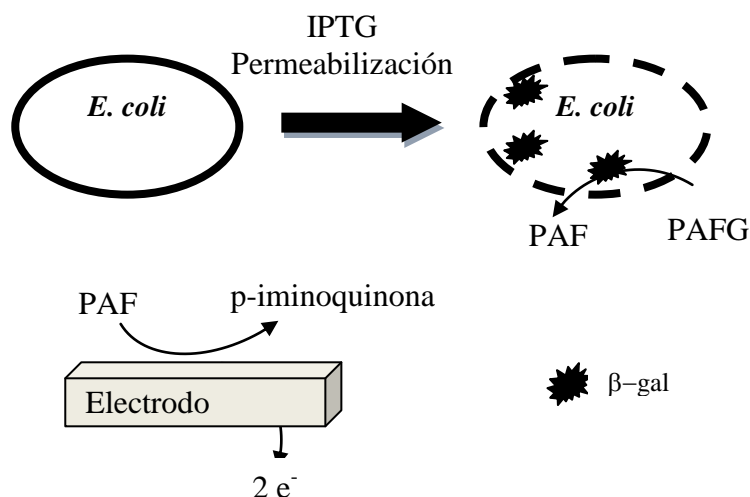


**Figura 5.1.** a) Reacción de hidrólisis de PAFG catalizada por  $\beta$ -gal y producción de PAF;  
b) Oxidación de PAF a p-iminoquinona.

Por lo tanto, favorecer el contacto enzima-sustrato PAFG y aumentar la producción de enzima intracelular, permitirían mejorar la sensibilidad de la técnica de

detección basada en la actividad de  $\beta$ -gal. En este trabajo se utilizaron el isopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), para inducir la expresión de genes que codifican la expresión de  $\beta$ -gal, y permeabilizadores de pared celular, particularmente el sulfato de polimixina B (SPM), para facilitar la interacción entre el sustrato y la enzima.

El procedimiento utilizado para la detección de ETEC F4 se representa en la Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Esquema del procedimiento empleado para la detección de ETEC F4 en base a la actividad de la  $\beta$ -gal.

Por otra parte, debido a que la  $\beta$ -gal se encuentra en una gran variedad de bacterias, no es posible distinguir de manera selectiva las cepas patógenas como ETEC F4 de otras cepas. A fin de lograr la selectividad deseada, se utilizaron anticuerpos anti ETEC F4 para llevar a cabo un procedimiento de inmunocaptura. Se conjugaron partículas magnéticas modificadas en su superficie con proteína G con un anticuerpo policlonal anti-ETEC F4 (PM-pAb) para separar selectivamente a las bacterias a partir de una suspensión. El uso de partículas magnéticas con proteína G unida covalentemente a la superficie confiere una unión específica y una orientación apropiada de los complejos PM-pAb. Luego de incubar con las suspensiones de bacterias, a temperatura ambiente y bajo agitación, se formaron los complejos PM-pAb-ETEC F4. Estos se colocaron sobre el electrodo, se agregaron los reactivos SPM y PAFG y mediante VOC se detectó la oxidación del PAF.

Previamente al desarrollo del magneto-inmunosensor, se realizaron experiencias que permitieron optimizar las condiciones de trabajo. En primer lugar se analizó la respuesta electroquímica del PAF y del PAFG, fijando así los parámetros de la VOC. Luego se optimizaron las variables relacionadas con el principio de detección: tiempo de reacción entre el sustrato PAFG y la suspensión de bacterias ( $t_r$ ), tiempo de permeabilización con SPM, tiempo de incubación con IPTG y concentraciones de IPTG, PAFG y SPM.

Posteriormente se optimizaron los parámetros relacionados con el inmunosensor: concentración de anticuerpo de captura y volumen de partículas magnéticas. Se realizaron curvas de calibrado utilizando suspensiones de bacterias preparadas en SAFS y también se realizó la cuantificación en muestras de materia fecal porcina.

Finalmente, se realizó la validación del magneto-inmunosensor frente a la técnica convencional de cultivo y recuento en placas.

### 5.2. Materiales y Reactivos

**Cepa ETEC F4 y medios de cultivo:** Se utilizaron los mismos que en el desarrollo del sensor bioelectroanalítico, por lo cual su descripción completa puede revisarse en la Sección 4.2.

La cepa ETEC F4 fue cedida por el grupo de Biotecnología Animal de la Fac. de Agronomía y Veterinaria (FAyV) de la UNRC, y mediante análisis por PCR se determinó que presenta los factores de virulencia F4, F18, LT y STb.

Los medios de cultivo utilizados fueron caldo tripteína soja (CTS), agar tripteína soja (ATS) y agar Mac Conkey.

**Solución amortiguadora de fosfatos 0,05 M pH 6 (SAF):** Se preparó con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,126 M y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1mM. El pH de esta solución se llevó a 6 mediante el agregado de HCl diluido 1/5.

**Solución amortiguadora de fosfatos salina 10 mM pH 7 (SAFS):** Se preparó con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, NaCl 136,9 mM y KCl 2,7 mM.

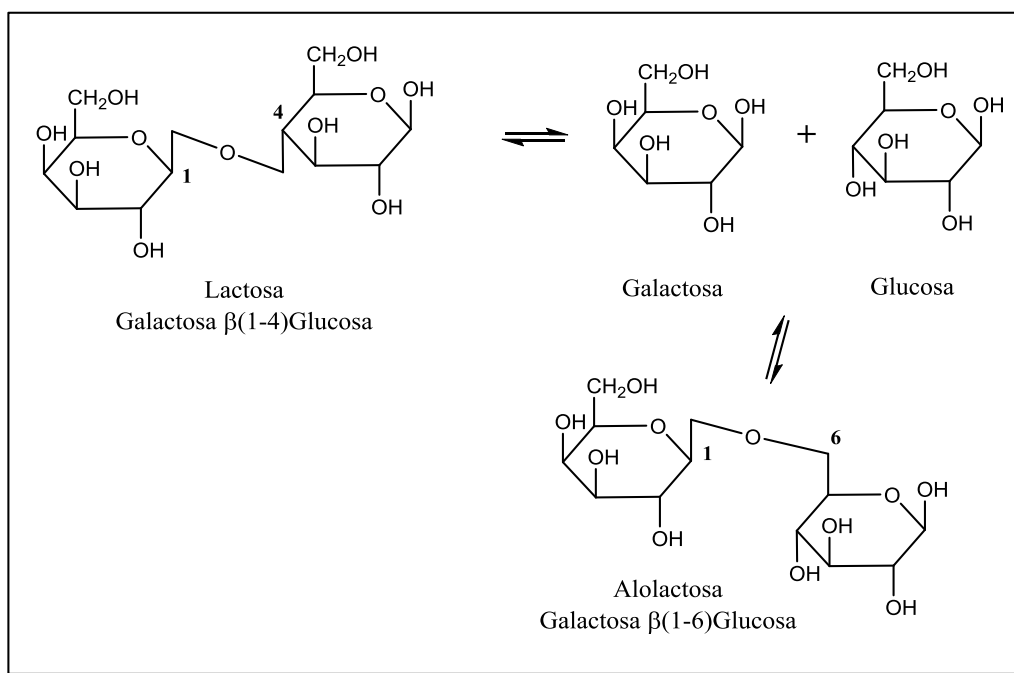
**p-aminofenol (PAF):** Para preparar soluciones de concentración variable de PAF, se utilizó PAF ChemCruz<sup>TM</sup> Biochemicals (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Las

concentraciones de PAF estuvieron comprendidas en un intervalo entre  $10^{-3}$  y  $10^{-8}$  M, en SAF.

**p-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (PAFG):** Fue adquirido de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Las soluciones de PAFG se prepararon en SAF.

**Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG):** Este reactivo (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se utilizó para inducir la expresión de genes que codifican la producción de  $\beta$ -galactosidasa.

Como se mencionó previamente, la  $\beta$ -gal hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa, pero también cataliza la producción de alolactosa a través de una reacción secundaria (Figura 5.3):



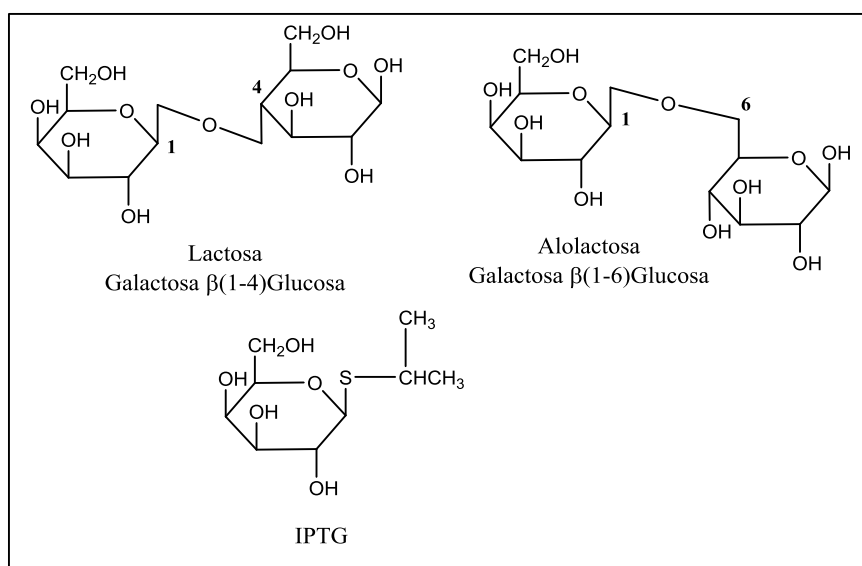
**Figura 5.3.** Reacciones catalizadas por la enzima  $\beta$ -gal.

Estructuralmente, la alolactosa es un disacárido similar a la lactosa, donde la D-galactosa y D-glucosa están unidas por un enlace glucosídico  $\beta(1-6)$  en lugar del  $\beta(1-4)$  de la lactosa (Figura 5.4).

Funcionalmente, la alolactosa es el inductor natural del operon lac que contiene el gen lacZ que codifica la  $\beta$ -gal, y cuya transcripción depende también de la inhibición del represor lac [2]. Así, cuando hay lactosa presente en el medio, la célula puede convertir

una pequeña parte en alolactosa. Ésta se une al represor lac con lo cual deja de reprimirse la transcripción del operón y se pueden sintetizar las enzimas que la célula necesita para captar más lactosa del medio e hidrolizarla como fuente de nutrientes o energía.

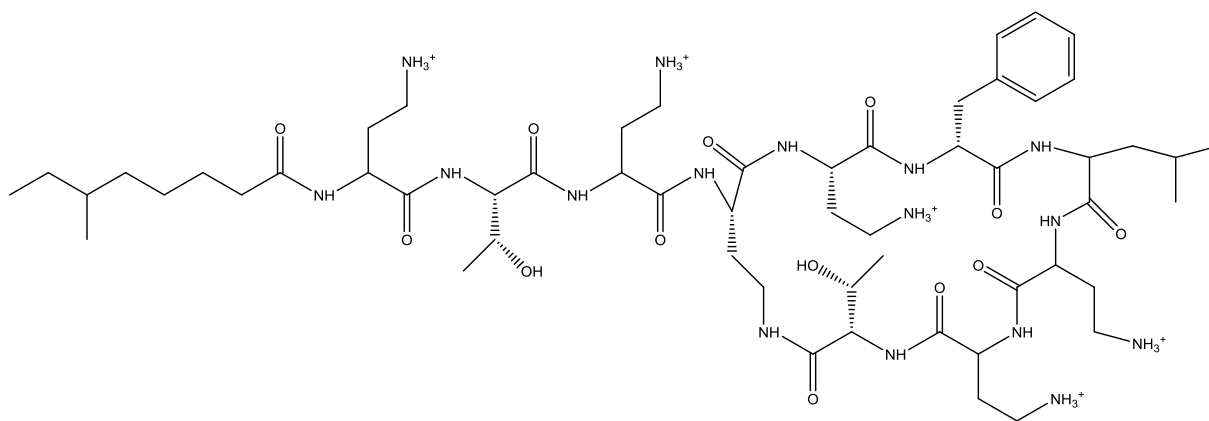
El IPTG es un análogo estructural de la alolactosa que puede unirse al represor de manera permanente y así inducir la producción de  $\beta$ -gal. Como puede verse en la Figura 5.4, a diferencia de la alolactosa, el átomo de azufre en el IPTG crea un enlace covalente no hidrolizable por la bacteria. De esta forma, se evita que el IPTG sea metabolizado progresivamente tras su adición a la suspensión bacteriana y su concentración permanece constante en el medio [3].



**Figura 5.4.** Estructuras de lactosa, alolactosa e IPTG.

En estas experiencias, el IPTG fue añadido al caldo tripteína soja que se utilizó para diluir el cultivo inicial de ETEC F4. Esta dilución con IPTG se incubó durante 30 min a 37 °C para inducir la producción de  $\beta$ -gal.

**Sulfato de Polimixina B (SPM):** Se empleó sulfato de polimixina B, Fluka Biochemika, que consiste en una mezcla de polimixinas B1 y B2.



**Figura 5.5.** Estructura de polimixina B.

La polimixina B (PMB) es un antibiótico cuya estructura básica (Figura 5.5) consiste en un anillo peptídico policationico y una cadena lateral peptídica con una cadena de ácidos grasos. Generalmente, la polimixina B es una mezcla de al menos cuatro componentes muy similares, pero que se diferencian en el ácido graso: Polimixinas B1 a B4, donde las polimixinas B1 y B2 son los dos componentes principales [4]. La forma comercial de este antibiótico es el sulfato de polimixina [ $\text{PMB}_2 (\text{SO}_4^{-2})_5$ ]. Es un agente bactericida de rápida acción, con un mecanismo de acción similar al de los detergentes. El anillo peptídico policationico interactúa con la membrana externa de las bacterias Gram negativas, compitiendo y desplazando a los iones  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$  que ayudan a estabilizar los lipopolisacáridos de la membrana. De esta manera, se originan “grietas” en la membrana externa que permiten el paso de distintos tipos de moléculas [5].

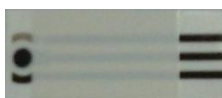
Las soluciones de sulfato de polimixina se prepararon en SAF.

**Partículas Magnéticas (PM):** Se utilizaron partículas superparamagnéticas Dynabeads<sup>®</sup> Protein G (Novex, Life Technologies), de tamaño uniforme de 2,8  $\mu\text{m}$ . La concentración de las partículas comerciales es de 30  $\text{mg mL}^{-1}$ , suspendidas en SAFS pH 7,4, con 0,01% Tween-20 y 0,09% azida de sodio. Estas partículas están conjugadas con Proteína G, la cual presenta una alta afinidad de unión con la región constante de inmunoglobulinas, permitiendo realizar la conjugación de las partículas con los anticuerpos mediante procedimientos sencillos y con la orientación adecuada.

**Anticuerpo policlonal anti-ETEC F4 (pAb):** Se utilizó un anticuerpo policlonal de oveja anti-*E. coli* K88ab, de Abcam. La concentración de esta inmunoglobulina es de

2,7 mg mL<sup>-1</sup>, en SAFS pH 7,2. Esta solución de anticuerpo se separó en pequeñas fracciones, las que se conservaron a -20°C. A partir de ellas se prepararon diluciones en SAFS.

**Electrodos:** Se utilizó un electrodo de capa impresa de carbono (ECIC) (Palm Sens Compact Electrochemical Interfaces), como se muestra en la Figura 5.6. El electrodo de trabajo es un disco de 3 mm de diámetro y, al igual que el contraelectrodo, es de carbono, mientras que el electrodo de pseudoreferencia es de plata.



**Figura 5.6.** Electrodo de capa impresa de carbono.

Se realizó un tratamiento previo al electrodo, sólo al inicio de las experiencias, que consistió en la activación en 30 µL de NaOH 1 M, aplicando un potencial de 1,2 V durante 300 segundos. De esta manera se buscó incrementar la/s velocidad/es de transferencia de electrones heterogénea/s del/os procesos redox, la/s cual/es puede/n verse disminuida/s debido a la composición de las tintas utilizadas en la fabricación de los electrodos [6].

**Potenciostato:** Las experiencias electroquímicas se realizaron con un potenciostato PGSTAT 101 Autolab (EcoChemie), acoplado a una PC con el software NOVA 1.7.

### 5.3. Metodología

#### 5.3.1. Suspensiones de ETEC F4

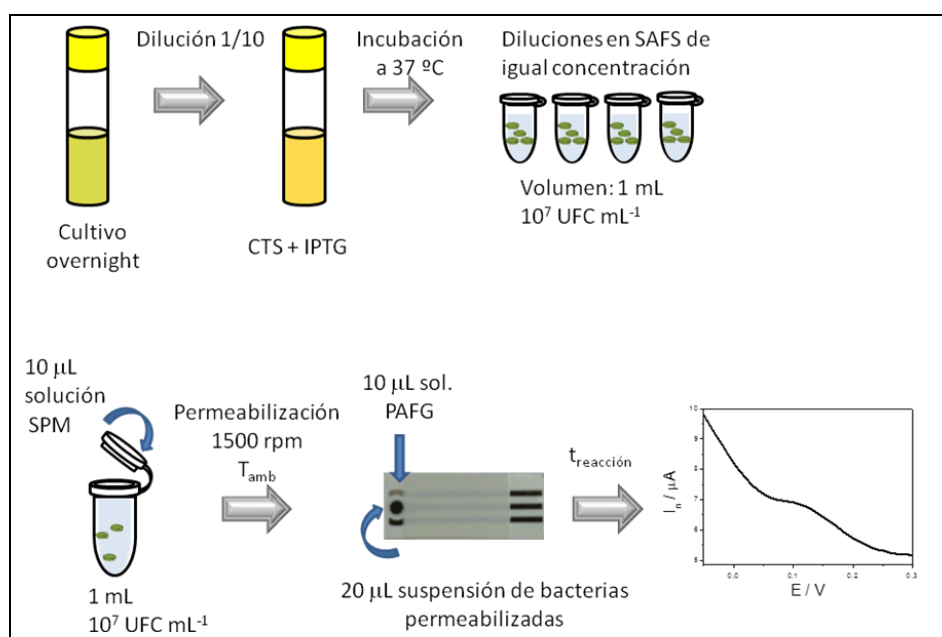
La cepa ETEC F4 se sembró en estrías sobre placas con ATS. Con una colonia aislada, se inoculó un CTS y se incubó durante aproximadamente 18 h (cultivo *overnight*) a 37 °C. Se determinó la concentración del cultivo *overnight* midiendo su DO y se realizó una dilución 1/10 en caldo tripteína soja con IPTG. Esta dilución se incubó nuevamente a



37 °C durante 30 min para inducir la producción de  $\beta$ -gal y a partir de ella se realizaron diluciones sucesivas en SAFS, que fueron las suspensiones utilizadas para las experiencias.

### 5.3.2. Optimización de condiciones para la detección de ETEC F4

El procedimiento general para optimizar las condiciones de detección se representa en la Figura 5.7:



**Figura 5.7.** Procedimiento empleado para optimizar las condiciones de detección de ETEC F4.

Luego de la incubación en caldo con IPTG, se prepararon diluciones de bacterias en SAFS de concentración aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> en un volumen de 1 mL. A cada una de ellas se les agregaron 10 µL de solución de permeabilizador SPM y se agitó a 1500 rpm.

Se colocaron 20 µL de estas suspensiones permeabilizadas sobre el ECIC y se agregaron 10 µL de solución de sustrato PAFG. El período transcurrido desde el agregado del sustrato PAFG al electrodo sobre el cual se encontraban las bacterias se denominó tiempo de reacción (t<sub>r</sub>). Este parámetro representa el tiempo necesario para que el metabolismo bacteriano produzca una cantidad detectable de p-aminofenol a partir de la

reacción entre PAFG y  $\beta$ -gal. Así, luego de un determinado  $t_r$ , se obtuvo la respuesta electroquímica por VOC.

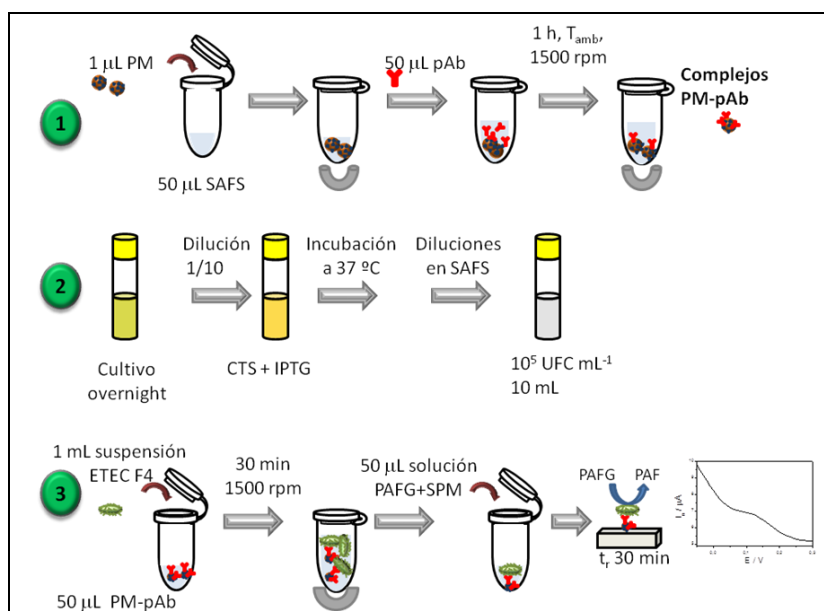
Mediante este procedimiento se optimizaron el tiempo de reacción, el tiempo de permeabilización ( $t_p$ ), el tiempo de incubación con IPTG, la concentración de sustrato PAFG y la concentración de IPTG.

### 5.3.3. Optimización del magneto-inmunosensor

Las variables relacionadas con el inmunoensayo electroquímico que se optimizaron fueron la concentración de anticuerpo de captura y el volumen de partículas magnéticas.

Antes de realizar las experiencias para la optimización de estas variables, se buscó simplificar el procedimiento de detección. Para ello, los reactivos SPM y PAFG se agregaron juntos, es decir, en una misma solución con sus concentraciones óptimas, y luego de un  $t_r$  de 30 min se midió la respuesta electroquímica. Debido a que no hubo diferencias significativas en las  $I_{p,n}$  obtenidas respecto a la metodología descrita anteriormente (Figura 5.7) se decidió agregar los reactivos SPM y PAFG en una misma solución. De esta manera, se consigue un ahorro significativo de tiempo.

En la Figura 5.8 se muestra el procedimiento que se siguió para optimizar las condiciones de trabajo utilizando el inmunosensor.



**Figura 5.8.** Esquema del procedimiento empleado para la detección de ETEC F4 utilizando el magnetoinmunosensor electroquímico. 1) Preparación de complejos PM-pAb; 2) Preparación de suspensiones de ETEC F4; 3) Formación de complejos PM-pAb – ETEC F4 y detección.

Se realizó la conjugación de las PM con el pAb. Para ello, 1  $\mu\text{L}$  de PM se suspendió en 50  $\mu\text{L}$  de SAFS y se realizaron 3 lavados con SAFS para eliminar los componentes como Tween y azida de sodio que poseen las partículas comerciales. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución de pAb ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), también preparada en SAFS, y se realizó la conjugación de las partículas durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación continua a 1500 rpm. Luego, los complejos PM-pAb se lavaron 3 veces con 100  $\mu\text{L}$  de SAFS, realizando una magnetoprecipitación entre enjuague, para eliminar el exceso de inmunoglobulinas que no se unieron a la superficie de las PM, y se resuspendieron en 50  $\mu\text{L}$  de SAFS hasta el momento de su utilización.

Por otra parte, a partir de una dilución en caldo con IPTG, incubado durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ , se preparó una suspensión de 10 mL de bacterias en SAFS. La concentración de esta dilución fue del orden de  $10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ .

La formación de los complejos PM-pAb y ETEC F4 se realizó agregando 1000  $\mu\text{L}$  de dilución de bacterias ( $10^5 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) a cada eppendorf con los complejos PM-pAb. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente bajo agitación a 1500 rpm.

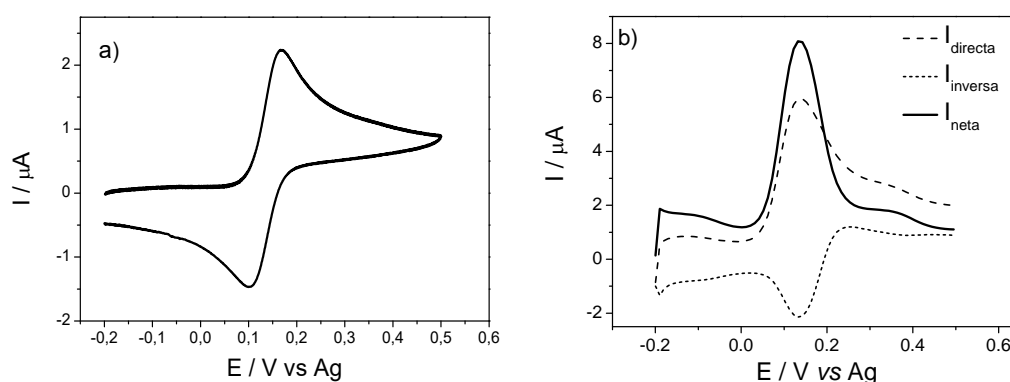
Finalmente, los complejos PM-pAb-ETEC F4 se lavaron 3 veces con SAFS (precipitando el complejo con un imán para retirar el sobrenadante), y se les agregaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de PAFG y SPM, preparada en SAF. El complejo formado por PM-pAb y ETEC F4 se resuspendió mediante agitación mecánica y el volumen completo de suspensión se colocó sobre el ECIC y luego de 30 min se midió por VOC la oxidación de PAF.

## 5.4. Resultados y Discusión

### 5.4.1. Análisis del comportamiento electroquímico del PAF y del PAFG

Con el objetivo de fijar los parámetros de la VOC para detectar la actividad de  $\beta$ -gal en suspensiones de bacterias, se comenzó con el estudio de la oxidación electroquímica de PAF. Para ello, se preparó una solución  $10^{-4}$  M de PAF en SAF y se depositaron 50  $\mu\text{L}$  de esta solución sobre el electrodo activado. Se realizó un voltamperograma cíclico a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  entre 0 y +0,7 V vs Ag (Figura 5.9.a).

Luego se midió por VOC en una ventana de potencial desde -0,2 a 0,5 V vs Ag, con una frecuencia de 25 Hz,  $\Delta E_e = 5 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_{oc} = 50 \text{ mV}$ ,  $t_{eq} = 20 \text{ s}$  (Figura 5.9.b). Los parámetros de la VOC se ajustaron de manera de optimizar la señal electroquímica de diluciones comprendidas entre  $10^{-3}$  y  $10^{-8}$  M teniendo en cuenta que la oxidación del PAF es una transferencia cuasi reversible bieletrónica.

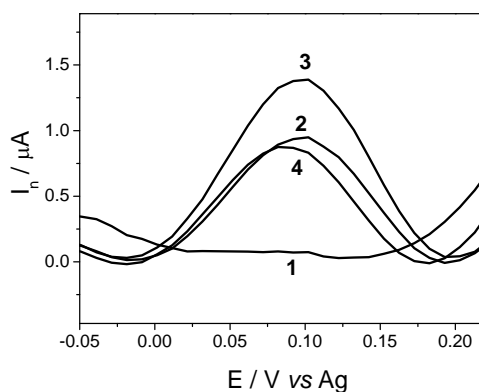


**Figura 5.9.** Respuesta electroquímica de una solución  $10^{-4}$  M de PAF utilizando un ECIC mediante **a)** VC a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  y **b)** VOC a una frecuencia de 25 Hz.

Por VC se observó un pico de oxidación bien definido centrado en 0,15 V vs Ag, y su correspondiente pico de reducción cercano a 0,10 V vs Ag, mostrando un  $\Delta E_p = 65$  mV. Mediante VOC, el pico de la corriente directa se observó a un potencial de 0,136 V, el de la corriente inversa a 0,131 V y el de la corriente neta a  $E_p = 0,134$  V, todos referidos al electrodo de Ag. Debido a la forma en que se muestrea la corriente en esta técnica y el comportamiento cuasi reversible del PAF, se consiguió una mejor sensibilidad mediante VOC. Por lo tanto, todas las experiencias con bacterias se realizaron utilizando esta técnica con una frecuencia de 25 Hz,  $\Delta E_e = 5$  mV,  $\Delta E_{oc} = 50$  mV,  $t_{eq} = 20$  s.

Por otra parte, también se analizó el comportamiento electroquímico del sustrato PAFG con la finalidad de ver si era susceptible de oxidarse electroquímicamente en la misma región de potencial que lo hace el PAF. Así, se preparó una solución de PAFG en SAF de concentración  $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ . Sobre el electrodo activado se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de SAF y 10  $\mu\text{L}$  de solución de PAFG.

En una experiencia, se tomaron voltamperogramas de onda cuadrada de manera consecutiva y a determinados intervalos de tiempo, sin realizar ningún tratamiento al electrodo entre medidas. Como puede verse en la Figura 5.10, en el primer voltamperograma no se observaron picos. Sin embargo, si en esta misma solución se realizan voltamperogramas de onda cuadrada consecutivos a determinados intervalos de tiempo, comienza a observarse un pico de oxidación con un valor de  $E_p$  próximo al obtenido para la oxidación por VOC del PAF.



**Figura 5.10.** Voltamperogramas de onda cuadrada consecutivos de PAFG a distintos tiempos desde el agregado del sustrato a la superficie del ECIC: 1) 1 min, 2) 3 min, 3) 5 min y 4) 10 min.

Este comportamiento coincide con lo obtenido por otros autores mediante voltamperometría cíclica y utilizando electrodos de grafito y carbono vítreo [1,7]. En dichas publicaciones, se observó un pico de oxidación centrado en 0,49 V (vs Ag/AgCl), y su correspondiente pico de reducción, debido a la ruptura del enlace éster del PAFG. A partir del segundo barrido los picos fueron idénticos a los del PAF. De esta manera cabe esperar que el pico de oxidación encontrado en presencia de PAFG se deba a la oxidación de los productos liberados cuando se rompe el enlace éster de este compuesto.

Por otra parte, la  $I_{p,n}$  disminuyó al realizar voltamperogramas consecutivos de la solución de PAFG debido, posiblemente, a la pasivación de la superficie del electrodo.

Se realizó otra experiencia en la cual se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de SAF y 10  $\mu\text{L}$  de solución de PAFG sobre el electrodo activado, se registró un voltamperograma y, luego de enjuagar el electrodo sólo con agua, se repitió la medida variando la concentración de PAFG. En este caso no se observaron picos en la ventana de potencial, con lo cual se comprobó que la oxidación heterogénea de PAFG sobre la superficie del electrodo puede evitarse si el electrodo es enjuagado con agua entre medidas consecutivas.

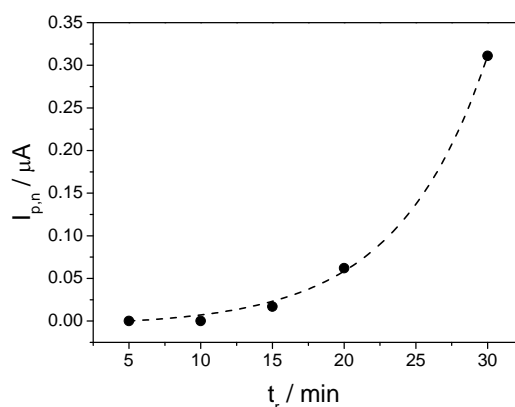
Por lo tanto, sólo al inicio de las experiencias, al ECIC se le realizó un pretratamiento que consistió en su activación a 1,2 V durante 300 seg en NaOH 1 M, tal como se describió en la sección experimental. Luego, entre cada medida realizada con las suspensiones de bacterias, el electrodo se enjuagó con agua y se realizó sólo una determinación por VOC para cada experiencia. De esta manera, se evitó que la señal del PAFG afecte la señal oxidativa del PAF producido por las bacterias luego de metabolizar el PAFG.

### 5.4.2. Optimización de las condiciones de detección de ETEC F4

#### Tiempo de reacción con PAFG

Para estas experiencias, se incubó una dilución de bacterias preparada a partir de un cultivo *overnight*, en CTS con IPTG 0,5 mM durante 3 h a 37°C. Luego, se prepararon 5 suspensiones bacterianas de la misma concentración en SAFS y a cada una de ellas se le agregó 10  $\mu\text{L}$  de solución de SPM de concentración 1 mg mL<sup>-1</sup>. Así, la concentración final de SPM en cada tubo fue 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cada solución contenida en un tubo eppendorf se incubó 1 h a temperatura ambiente y agitando a 1500 rpm.

Para analizar la variación de la  $I_{p,n}$  con el tiempo de reacción entre  $\beta$ -gal y PAFG, se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión de bacterias permeabilizada sobre el electrodo y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de solución de PAFG 1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Se tomaron voltamperogramas de onda cuadrada a  $t_r$  de 5 y 10 min, no observándose respuesta electroquímica en ninguno de ellos. Luego de 15 min, la cantidad de PAF producida por la hidrólisis catalizada por la  $\beta$ -gal bacteriana pudo detectarse por VOC y aumentó con el  $t_r$  (Figura 5.11). Por cuestiones prácticas, el  $t_r$  máximo que se analizó fue de 30 min y en él se obtuvo la mayor  $I_{p,n}$  para una suspensión de bacterias de concentración  $1,70 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ . De esta manera, 30 min fue el valor de  $t_r$  que se eligió para realizar las demás experiencias.



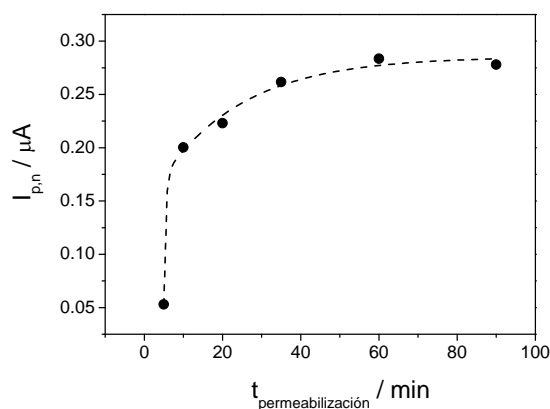
**Figura 5.11.** Optimización del tiempo de reacción entre el sustrato PAFG ( $0,33 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y la enzima  $\beta$ -gal.

### Tiempo de permeabilización con SPM

De manera similar a la experiencia anterior, una suspensión de bacterias en CTS con IPTG 0,5 mM se incubó durante 3 h a  $37^\circ\text{C}$ . Se prepararon diluciones de la misma concentración en SAFS y a cada una de ellas se les agregaron 10  $\mu\text{L}$  de solución de SPM 1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Cada tubo se incubó a temperatura ambiente y 1500 rpm, durante tiempos de permeabilización de 5, 10, 20, 40, 60 y 90 min. Así, 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión de bacterias permeabilizada se colocaron sobre el electrodo y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de solución de PAFG 1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Luego de 30 min desde el agregado del sustrato al electrodo se registraron los voltamperogramas de onda cuadrada.

Para una concentración de SPM de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se analizó el grado de permeabilización en función de la variación de la  $I_{p,n}$  para tiempos de permeabilización

comprendidos entre 5 y 90 min. Como puede verse en la Figura 5.12, se produce un gran aumento de la  $I_{p,n}$  entre los 5 y los 40 min; posteriormente, la variación en la corriente no fue significativa, sino más bien tiende a disminuir luego de 60 min.



**Figura 5.12.** Optimización del tiempo de permeabilización con sulfato de polimixina B ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

En base a este comportamiento, se utilizó un tiempo de permeabilización de 20 min para las experiencias de optimización de la detección de ETEC F4 que se describen en esta Sección. La elección de este tiempo se debió a que los procedimientos de permeabilización con la polimixina y la producción de PAF se realizaron por separado. De esta forma, se requieren 20 min de permeabilización y luego 30 min de reacción con el PAFG antes de realizar la VOC.

En cambio, en las experiencias que se realizaron con el magnetoinmunosensor los reactivos SPM y PAFG se agregan en simultáneo (es decir, en una misma solución en las concentraciones óptimas) a la suspensión de bacterias. En este caso, se entendió que 30 min eran suficientes para garantizar una permeabilización óptima y la producción de cantidades detectables de PAF.

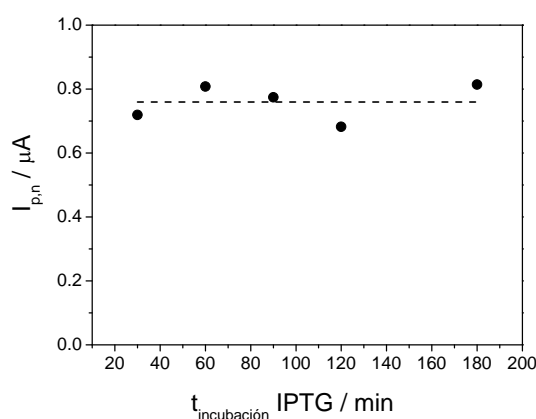
### Tiempo de incubación con IPTG

Las suspensiones de bacterias en SAFS se prepararon a partir de un CTS con IPTG 0,5 mM incubado durante tiempos variables: 30, 60, 90, 120 y 180 min. A cada dilución se le agregó 10  $\mu\text{L}$  de solución de SPM  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  y se incubaron durante 20 min bajo agitación para permitir la permeabilización. Así, 20  $\mu\text{L}$  de cada suspensión de bacterias permeabilizada se colocaron sobre el electrodo y se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de solución



de PAFG  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ , con lo cual la concentración de PAFG sobre el electrodo fue de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Luego de 30 min desde el agregado del sustrato al electrodo se obtuvieron los voltamperogramas de onda cuadrada.

En la Figura 5.13 puede verse la relación entre las  $I_{p,n}$  y el tiempo de incubación con IPTG de concentración  $0,5 \text{ mM}$ , en suspensiones de bacterias de concentración  $1,40 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ . Se analizaron tiempos de incubación comprendidos entre los 30 y 180 min. En este intervalo de tiempo, se observaron valores de  $I_{p,n}$  centrados en  $0,75 \mu\text{A}$ , con una variación máxima de  $0,132 \mu\text{A}$ .



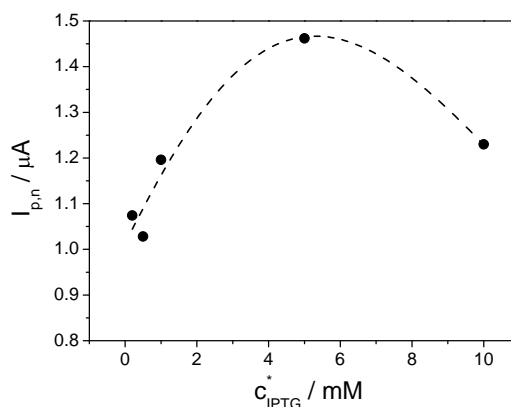
**Figura 5.13.** Optimización del tiempo de incubación con IPTG de concentración  $0,5 \text{ mM}$ .

Se decidió utilizar un tiempo de 30 min para inducir la producción de la enzima  $\beta$ -gal, disminuyendo así el tiempo total de análisis.

### Concentración de IPTG

A partir del cultivo *overnight* se realizaron diluciones de bacterias de igual concentración en caldo tripteína soja con concentraciones variables de IPTG:  $0,2$ ;  $0,5$ ;  $1$ ;  $5$  y  $10 \text{ mM}$ . Cada dilución se incubó durante 30 min y luego se prepararon las diluciones en SAFS. Se realizó la permeabilización con  $10 \mu\text{L}$  de SPM  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  durante 20 min y las medidas electroquímicas se hicieron luego de 30 min de agregar el sustrato a una concentración de PAFG igual a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Se observó una  $I_{p,n}$  máxima utilizando IPTG  $5 \text{ mM}$  (Figura 5.14) y esta concentración se utilizó para la inducción de la enzima  $\beta$ -gal.

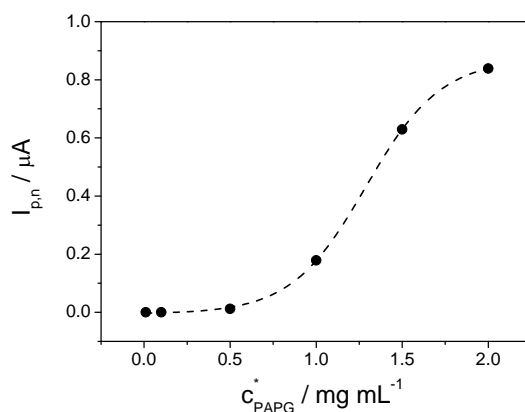


**Figura 5.14.** Optimización de la concentración de IPTG.

### Concentración de sustrato PAFG

Se prepararon diluciones de bacterias en SAFS a partir de un cultivo en CTS con IPTG 5 mM, incubado durante 30 min. Se realizó la permeabilización con 10  $\mu L$  de SPM 1  $\text{mg mL}^{-1}$  durante 20 min y agitación a 1500 rpm. Las medidas de VOC se hicieron luego de 30 min de agregar soluciones de PAFG cuya concentración estuvo comprendida entre 0,01 y 2  $\text{mg mL}^{-1}$  (concentración final sobre el electrodo).

Como se muestra en la Figura 5.15, se requieren al menos 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  de PAFG para comenzar a observar la oxidación electroquímica del PAF por VOC. A partir de este valor, la  $I_{p,n}$  aumenta con la concentración de sustrato. Por otra parte, concentraciones más grandes de PAFG tienden a producir una mayor cantidad de productos debido a la ruptura del enlace éster, los cuales interfieren en la oxidación del PAF generado enzimáticamente. De esta manera, la solución de PAFG que se eligió para las experiencias con el magnetoinmunosensor tuvo una concentración de 2  $\text{mg mL}^{-1}$ .



**Figura 5.15.** Optimización de la concentración de PAFG.

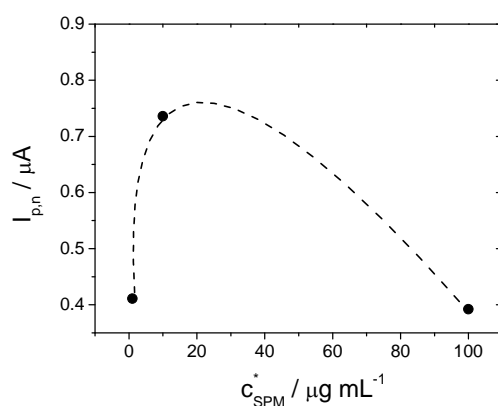
### 5.4.3. Optimización del magneto-inmunosensor electroquímico

#### Concentración de SPM

La variación de la  $I_{p,n}$  con la concentración del permeabilizador SPM se analizó utilizando el magnetoinmunosensor. De esta forma, además de optimizar la concentración de SPM, estos estudios iniciales permitieron observar la factibilidad del magnetoinmunosensor propuesto para la detección de ETEC F4.

Los complejos PM-pAb se prepararon mediante el agregado de 1  $\mu\text{L}$  de PM y 50  $\mu\text{L}$  de solución de pAb de concentración  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se utilizaron 4 soluciones, preparadas en SAF 0,05 M, conteniendo  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de PAFG y concentraciones variables de SPM: 0,1; 1; 10 y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Como puede verse en la Figura 5.16, la  $I_{p,n}$  máxima se obtuvo con una concentración de SPM  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  y se seleccionó esta concentración para trabajar con el magneto-inmunosensor.



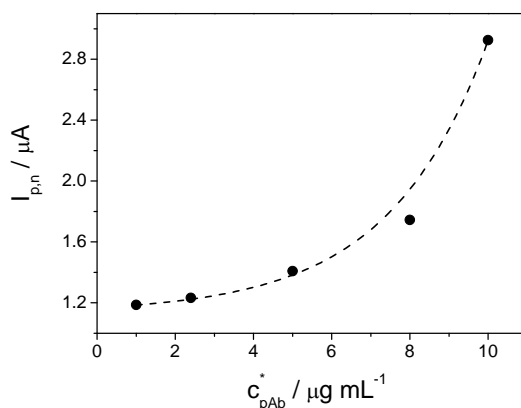
**Figura 5.16.** Optimización de la concentración de SPM.

#### Concentración de anticuerpo de captura

La concentración de trabajo de anticuerpo de captura (pAb) se determinó variando las concentraciones en un intervalo comprendido entre 1 y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Las experiencias se llevaron a cabo usando un volumen fijo de 2  $\mu\text{L}$  de PM y 50  $\mu\text{L}$  de solución de anticuerpo de distinta concentración.

Para las medidas se utilizó una solución compuesta por  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de PAFG y  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de SPM.

Se observó que la  $I_{p,n}$  aumenta con la concentración de pAb (Figura 5.17). En función de lo obtenido, se utilizó como concentración de trabajo  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Concentraciones mayores no fueron utilizadas a fin de evitar posibles capas de pAb, las que terminan afectando la sensibilidad y la reproducibilidad del inmunoensayo.

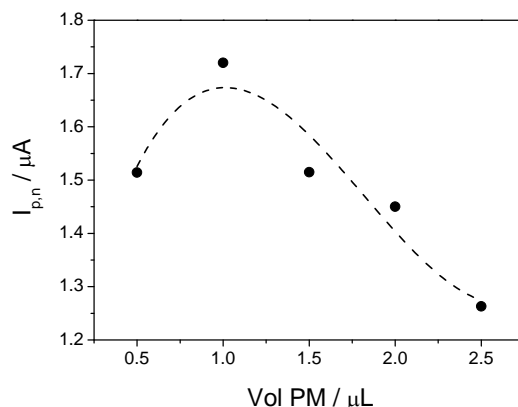


**Figura 5.17.** Optimización de la concentración de pAb.

### Optimización del volumen de partículas magnéticas

Para preparar los complejos PM-pAb se utilizaron volúmenes de suspensión de PM comprendidos entre  $0,5$  y  $2,5 \text{ } \mu\text{L}$ , formando un complejo a partir del agregado de  $50 \text{ } \mu\text{L}$  de solución de pAb de concentración  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Así, puede verse en la Figura 5.18 que la  $I_{p,n}$  es máxima cuando se utiliza  $1 \text{ } \mu\text{L}$  de partículas, por lo cual se eligió este valor como óptimo para realizar el inmunoensayo. Tal comportamiento puede ser explicado en función de un bloqueo superficial para la oxidación del PAF generado enzimáticamente.



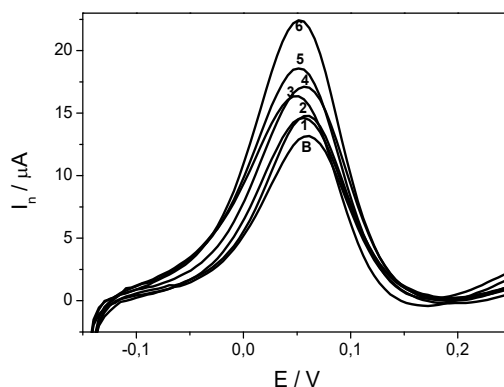
**Figura 5.18.** Optimización del volumen de PM.

#### 5.4.4. Curva de calibrado

En base a las experiencias previas, el procedimiento optimizado para la detección de ETEC F4, a partir de un cultivo *overnight*, utilizando el magnetoinmunosensor electroquímico propuesto es el siguiente:

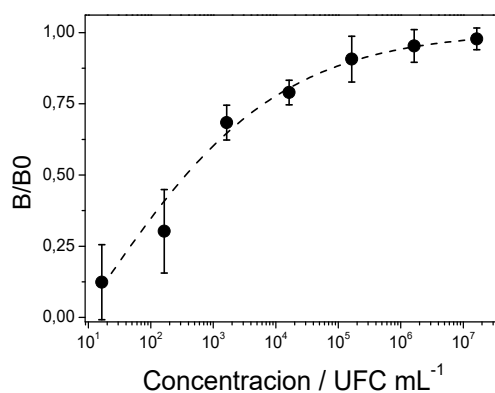
- Incubación de una dilución del cultivo *overnight* en caldo tripteína soja con IPTG 5 mM durante 30 min. Las suspensiones de bacterias se preparan a partir de este cultivo mediante diluciones en SAFS.
- Formación de los complejos PM-pAb: 1  $\mu\text{L}$  de PM y 50  $\mu\text{L}$  de solución de anticuerpo 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Incubación durante 1 h a temperatura ambiente y 1500 rpm. Lavados con magnetoprecipitación entre cada uno.
- 30 min de incubación de la suspensión bacteriana con los complejos PM-pAb, a temperatura ambiente y 1500 rpm de agitación. Lavados con magnetoprecipitación entre cada uno.
- Sobre el electrodo, colocar 20  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana y 10  $\mu\text{L}$  de solución con SPM (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y PAFG (2  $\text{mg mL}^{-1}$ ) durante 30 min.
- Detección por VOC: ventana de potencial desde -0,05 V a +0,250 V,  $t_{eq}$  20 seg,  $\Delta E_{OC}$  50 mV;  $\Delta E_e$  5 mV, frecuencia 25 Hz.

Siguiendo este procedimiento, se obtuvo la respuesta electroquímica de suspensiones de bacterias preparadas en SAFS, cuyo rango de concentración estuvo comprendido entre  $10^1 - 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , y del blanco (SAFS). En la Figura 5.19 se muestran los voltamperogramas de onda cuadrada que se obtuvieron.



**Figura 5.19.** Voltamperogramas de onda cuadrada utilizando el magneto-inmunosensor electroquímico de suspensiones ETEC F4 en SAFS: B) inmunoensayo sin ETEC F4, 1)  $10^1$ ; 2)  $10^2$ ; 3)  $10^3$ ; 4)  $10^4$ ; 5)  $10^5$  y 6)  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Estas experiencias se realizaron por quintuplicado, en 5 días distintos, y se obtuvo la curva de calibrado que se observa en la Figura 5.20.



**Figura 5.20.** Curva de calibrado de suspensiones ETEC F4 utilizando el magneto-inmunosensor electroquímico

El intervalo lineal estuvo comprendido entre  $1 \times 10^1$  -  $4 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. Se obtuvo una sensibilidad de  $4 \times 10^2$   $\mu$ A mL UFC<sup>-1</sup> y el límite de detección (3 veces la desviación estándar del blanco) fue 33 UFC mL<sup>-1</sup>.

### 5.4.5. Determinaciones en muestras

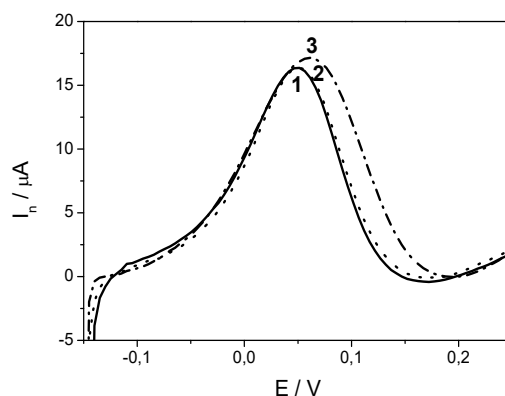
Las determinaciones en muestras de materia fecal porcina, provenientes de animales sanos, se realizaron siguiendo dos metodologías: 1) muestras diluidas en SAFS y 2) muestras diluidas e inactivadas mediante autoclave. La finalidad de este segundo procedimiento fue eliminar otras cepas *E. coli* que podrían encontrarse en la muestra y tener reactividad cruzada con el anticuerpo policlonal anti-ETEC F4.

Se agregó 1 g de materia fecal a 10 mL de SAFS, y se realizó un centrifugado durante 10 min a 500 rpm para separar los componentes sólidos de mayor tamaño, tales como granos de arena, piedras, palos, *etc.* El sobrenadante se separó en dos fracciones de 4,5 mL, una de las cuales se inactivó en autoclave durante 40 min a 121 °C mientras que la otra fracción se conservó a - 4°C hasta el momento de realizar las medidas. A cada una de ellas se les agregaron 500 µL de una suspensión de bacterias de concentración aproximadamente  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, preparada en SAFS como se describe a continuación.

Se preparó un cultivo *overnight*, y a partir de él se hizo una dilución 1/10 en CTS con IPTG 5 mM. Esta suspensión se incubó 30 min a 37 °C para favorecer la expresión de la enzima β-gal. A partir de este cultivo se hicieron diluciones en PBS 1/10 hasta una concentración  $10^1$  UFC mL<sup>-1</sup>. Luego, 500 µL de dilución  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> se agregaron a los 4,5 mL de cada muestra, de manera que la concentración en ellas fuese del orden de  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Con las demás suspensiones, cuya concentración estuvo comprendida entre  $10^1$  –  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, se repitió el procedimiento de la curva de calibrado.

En la Figura 5.21 se presentan los voltamperogramas que se obtuvieron a partir de las determinaciones en muestras.



**Figura 5.21.** Voltamperogramas de onda cuadrada de suspensiones de ETEC F4  $1,6 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> en 1) SAFS, 2) muestra de materia fecal porcina (dilución 1/10 y centrifugado) 3) muestra inactivada (dilución 1/10, centrifugado e inactivación)

La concentración de la suspensión de bacterias en SAFS, determinada por turbidimetría, fue  $1,6 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>.

En la muestra diluida y centrifugada (voltamperograma 2 de la Figura 5.21) se obtuvo una  $I_{p,n}$  0,596  $\mu$ A que corresponde, de acuerdo a la curva de calibrado, a una concentración de  $9,39 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>.

En el caso de la muestra diluida, centrifugada e inactivada (voltamperograma 3 de la Figura 5.21) la  $I_{p,n}$  fue 0,728, que correspondería a una concentración de  $4,36 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>. Cabe indicar que se observó una disminución en el volumen de la muestra luego de la inactivación del sobrenadante mediante el autoclave. Esto posiblemente se debió a la evaporación de la misma al someterse a altas temperaturas, y podría generar un error adicional en su concentración.

#### 5.4.6. Validación del magneto-inmunosensor

La validación se realizó frente a la técnica convencional de cultivo y recuento en placa, debido a la ausencia de pruebas inmunológicas comercialmente disponibles para la cuantificación de ETEC F4. Por otra parte, PCR es una de las técnicas moleculares más utilizadas en los laboratorios de diagnóstico veterinarios. Sin embargo, se emplea principalmente con fines cualitativos para detectar la presencia o ausencia de genes que codifican los factores de virulencia propios de ETEC F4. De esta manera, no sería una herramienta que permita validar el magneto-inmunosensor que aquí se describe.



Se preparó un cultivo *overnight* inoculando una colonia de ETEC F4 aislada sobre ATS y se incubó durante 18 h a 37 °C. Este cultivo se estandarizó en base a la escala de Mc Farland, que fue descrita en la Sección 4.3.3. De esta manera, la DO del inóculo *overnight* a una longitud de onda de 625 nm correspondió a una concentración de  $2,20 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Considerando las diluciones sucesivas 1/10 que se realizaron, la dilución que se determinó electroquímicamente y por conteo en placas correspondió a una concentración  $2,20 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>, de acuerdo a esta escala.

Para la validación del magneto-inmunosensor, se siguió el mismo procedimiento con el cual se realizaron las curvas de calibrado, utilizando las concentraciones de reactivos y tiempos de incubación optimizados. Se registró la respuesta electroquímica de las diluciones de bacterias en el intervalo de concentración entre  $10^1$  y  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> y, por triplicado, la respuesta de la dilución del orden  $10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>. En este caso, el valor de  $I_{p,n}$  que se obtuvo fue  $(0,52 \pm 0,10)$  µA que, en la curva de calibrado realizada con el magneto-inmunosensor, corresponde a una concentración de  $(4,1 \pm 0,8) \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>. Considerando la variabilidad en las corrientes del blanco, se obtuvo un error relativo porcentual de alrededor del 20 %.

Por otra parte se sembraron 100 µL, por triplicado, de la dilución del orden  $10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> sobre placas con ATS. Estas se incubaron durante 24 h a 37 °C y posteriormente se contó el número de colonias sobre cada placa. El valor promedio que se obtuvo fue  $(1,82 \pm 0,45) \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>, con un error relativo porcentual de aproximadamente el 25 %.

Cabe mencionar que mediante la técnica de cultivo en placas, no es posible determinar experimentalmente la concentración de todas las suspensiones de bacterias. La norma internacional de referencia para los laboratorios de análisis microbiológicos es la “ISO 7218:2007 Requisitos generales y guía para el examen microbiológico” [8]. En dicha normativa se establece que el resultado del conteo debe estar comprendido entre 30 y 300 UFC mL<sup>-1</sup>. Valores superiores representan un número excesivo de colonias que no pueden visualizarse de manera definida en las placas, mientras que en placas con menos de  $10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> los errores experimentales pueden ser muy significativos. Por lo tanto, la concentración de las suspensiones restantes se debe calcular en base al número de diluciones realizadas.

De esta manera, el error asociado a la técnica de recuento en placas está sujeto a varios factores. Generalmente, para calcular el error de esta técnica se consideran tres

fuentes principales de error: el material volumétrico y los equipos utilizados, la preparación de diluciones y los errores relacionados con el analista (como la distribución de las unidades formadoras de colonias en cada placa y la facilidad para detectar visualmente a las colonias) que influirán, finalmente, sobre el conteo. Por lo tanto, el error relativo de la técnica de cultivo y recuento en placas se estima entre el 10 y el 35 % [9-11].

Estos resultados demuestran que la concentración y el error relativo porcentual que se obtuvieron utilizando el magneto-inmunosensor electroquímico fueron del mismo orden que los obtenidos por conteo en placas, e indican un buen desempeño del sensor.

### 5.5. Conclusiones

Se desarrolló un magnetoinmunosensor electroquímico para la detección selectiva de ETEC F4 en base a la enzima intracelular  $\beta$ -gal. Mediante este sistema se detectan sólo células vivas y, además, no requiere de la utilización de un anticuerpo secundario marcado lo cual disminuye el tiempo del procedimiento y también los costos.

La hidrólisis del sustrato PAFG, catalizada por la  $\beta$ -gal, generó como producto electroactivo el p-aminofenol y su oxidación se detectó por voltamperometría de onda cuadrada.

Las suspensiones de bacterias fueron pretratadas con IPTG y permeabilizadas con SPM para mejorar la sensibilidad de la técnica. Se optimizaron variables que influyen sobre el principio de detección y el diseño del inmunosensor. De esta manera, se redujeron las concentraciones de reactivos utilizadas y los tiempos de análisis necesarios para la detección de la bacteria.

Por otra parte, la utilización de partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-ETEC F4 permitió capturar de manera eficiente al antígeno y “concentrarlo” sobre la superficie del electrodo. Así, empleando el magnetoinmunosensor electroquímico se obtuvieron valores de corriente mayores con respecto a la detección realizada cuando la reacción enzimática se llevaba a cabo en el seno de la solución.

La detección electroquímica de la actividad de  $\beta$ -gal generalmente se realiza utilizando amperometría [3,12,13] o voltamperometría cíclica [14]. Así, la realización de estos estudios utilizando voltamperometría de onda cuadrada es una propuesta innovadora que permite desarrollar una metodología rápida y sensible debido a las ventajas propias de la técnica.

El límite de detección que se obtuvo con el magneto-inmunosensor electroquímico fue 33 UFC mL<sup>-1</sup>. Este valor es menor que los LD generalmente informados por otros autores, cuyos valores superan la concentración de 10<sup>3</sup> UFC mL<sup>-1</sup> [3,12,13]. Si bien en algunas publicaciones se pudieron detectar concentraciones muy bajas como 1 UFC mL<sup>-1</sup> [14], estos procedimientos requirieron de 4 h de incubación con IPTG y, durante este tiempo, caben amplias posibilidades de que se modifique la concentración de *E. coli*.

Por otra parte, se demostró la posibilidad de detectar y cuantificar a la bacteria ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina, mediante un sencillo procedimiento de preparación de las muestras.

Las concentraciones que se obtuvieron con el magneto-inmunosensor electroquímico fueron similares a las obtenidas mediante la técnica de cultivo y recuento en placa, lo cual indica un buen desempeño del sensor.

### Referencias

- (1) Huang, H., Xiao, X., Gao, H., Sun, S., Feng, J., Luo, G.: Rapid detection of *Escherichia coli* by electrochemical assay of  $\beta$ -D-galactosidase with p-aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as substrate. *Tsinghua Sci. Technol.* **2002**, 7, 624-628.
- (2) Marbach, A., Bettenbrock, K.: lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J. Biotechnol.* **2012**, 157, 82-88.
- (3) Laczka, O., García-Aljaro, C., Del Campo, F.J., Pascual, F.X., Mas-Gordí, J., Baldrich, E.: Amperometric detection of *Enterobacteriaceae* in river water by measuring  $\beta$ -galactosidase activity at interdigitated microelectrode arrays. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 677, 156-161.
- (4) Zavascki, A. P., Goldani, L.Z., Li, J., Nation, R.L.: Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2007**, 60, 1206-1215.
- (5) Hermesen, E. D., Sullivan, C.J., Rotschafer, J.C.: Polymyxins:: Pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2003**, 17, 545-562.
- (6) Wang, J., Pedrero, M., Sakslund, H., Hammerich, O., Pingarron, J.: Electrochemical activation of screen-printed carbon strips. *Analyst* **1996**, 121, 345-350.
- (7) Mássen, M.; Liu, Z.; Haruyama, T.; Kobatake, E.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M.: Immunosensing with amperometric detection, using galactosidase as label and p-aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as substrate. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 304, 353-359.
- (8) International Standarization Organization: Microbiology of food and animal feeding stuffs: general requirements and guidance for microbiological examinations. ISO 7218:2007.
- (9) Párraga, K. J., Pilla, P.M.: Verificación de los métodos para la determinación de coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2013.

- (10) Pozo, L., Mucchiut, M., Olmedo, M., Cattapan, R., Ziolo, J., Peralta Apeseche, J., Alvarez, M. : Reproducibilidad y repetibilidad en el recuento de microorganismos mesófilos totales como una base para el cálculo de incertidumbre. INTI 5° Jornadas de Desarrollo e Innovación. Noviembre de 2004.
- (11) Menéndez López, A.: Validación y cálculo de incertidumbre para la determinación de microorganismos indicadores, mediante microbiología clásica y NMP automatizado, en matrices cárnicas. Universidad de Oviedo, 2013.
- (12) Neufeld, T., Schwartz-Mittelmann, A., Biran, D., Ron, E.Z., Rishpon, J.: Combined phage typing and amperometric detection of released enzymatic activity for the specific identification and quantification of bacteria. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 580-585.
- (13) Mittelmann, A. S., Ron, E.Z., Rishpon, J.: Amperometric quantification of total coliforms and specific detection of *Escherichia coli*. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 903-907.
- (14) Noh, S., Choe, Y., Tamilavan, V., Hyun, M.H., Kang, H.Y., Yang, H.: Facile electrochemical detection of *Escherichia coli* using redox cycling of the product generated by the intracellular  $\beta$ -d-galactosidase. *Sensor Actuat B-Chem.* **2015**, 209, 951-956.

### CAPITULO 6. CONCLUSIONES GENERALES

En esta Tesis Doctoral se estudió el comportamiento electroquímico de suspensiones de bacterias ETEC F4 utilizando voltamperometría de onda cuadrada y electrodos de carbono vítreo desnudo y modificados con nanomateriales. Estas experiencias condujeron al desarrollo de un sensor bioelectroanalítico para la detección y cuantificación de la bacteria ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina.

El sensor bioelectroanalítico se basó en la transferencia directa de electrones entre el microorganismo y el electrodo. Se utilizaron electrodos de carbono vítreo desnudo, modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple dispersos en agua y dispersos en agua-Nafión. Como contraelectrodo se empleó un electrodo de platino de gran área y el electrodo de referencia fue de Ag/AgCl. Con respecto a las suspensiones de bacterias, se trabajó con bacterias vivas e inactivadas mediante autoclave y ultrasonido.

En todos los casos, la respuesta electroquímica consistió en un pico de oxidación irreversible, cuya intensidad fue mayor al utilizar los electrodos modificados debido al aumento del área electroactiva. También, la dispersión de nanotubos de carbono en agua y Nafión fue más homogénea, permitiendo resultados más precisos. Así, los estudios posteriores se realizaron con el electrodo modificado con dispersiones de nanotubos de carbono en agua y Nafión. Debido a que se observó un comportamiento mixto: difusión/adsorción para la oxidación de suspensiones de bacterias, el procedimiento para la detección de ETEC F4 requirió la preconcentración durante 10 min, mediante un agitador magnético, y la posterior detección por voltamperometría de onda cuadrada.

Se analizó la influencia de distintas variables sobre la respuesta electroquímica y se establecieron condiciones óptimas para la detección y cuantificación de la bacteria. Los factores que influyeron sobre la intensidad de la corriente de pico neta ( $I_{p,n}$ ) fueron muy diferentes en función de la viabilidad o no de los microorganismos.

En el caso de las bacterias vivas, los resultados obtenidos permitieron inferir dos caminos para la respuesta de oxidación. Uno de ellos fue el contacto directo entre la membrana externa de las células y el electrodo. El otro mecanismo estuvo relacionado con la producción, por parte del microorganismo, de moléculas solubles en estado reducido y que fueron liberadas al medio donde se encontraban las bacterias. Esto permitió explicar la dependencia entre la  $I_{p,n}$  y la fase de crecimiento de los microorganismos, debido a los cambios que ocurren en la permeabilidad de las membranas celulares en función de la fase

de crecimiento. Además, hizo evidente la necesidad de mantener un mayor control sobre las condiciones experimentales, principalmente el tiempo transcurrido desde la preparación de las suspensiones de bacterias hasta el momento de la detección, a fin de disminuir la variabilidad en la intensidad de la respuesta electroquímica. También se analizó la posible influencia de la respiración aeróbica y anaeróbica de ETEC, pero no se observó un efecto significativo sobre la  $I_{p,n}$ . Por lo tanto, cuando se trabajó con suspensiones de bacterias vivas, la  $I_{p,n}$  no sólo dependió de la concentración sino que también estuvo limitada por la permeabilidad de las membranas celulares y el transporte de sustancias electroactivas desde la célula hacia el medio exterior.

Para superar esta limitación, las suspensiones de bacterias fueron sometidas a tratamientos donde se realizó la disrupción de las membranas celulares y luego se analizó la respuesta electroquímica siguiendo la misma metodología. La lisis celular se realizó por ultrasonido y también por un tratamiento térmico en autoclave, obteniéndose una mayor sensibilidad en este último caso. Así, se realizaron curvas de calibrado utilizando suspensiones de bacterias preparadas en solución amortiguadora de fosfatos e inactivadas en autoclave y se obtuvieron los principales parámetros de interés analítico.

La bacteria se detectó en muestras de materia fecal porcina utilizando este sensor bioelectroquímico. El procedimiento de preparación de la muestra consistió en una dilución en solución amortiguadora de fosfatos y un ligero centrifugado. Para la cuantificación en muestras se utilizó el método de adiciones estándar. Se realizaron agregados sucesivos de suspensiones ETEC F4 (inactivadas) al sobrenadante de las muestras y se observó la respuesta electroquímica de muestras de materia fecal. La metodología resultó rápida, precisa, económica y podría utilizarse para monitorear la presencia de ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina. Si bien el sensor no es selectivo, las posibles interferencias en la señal son despreciables cuando la muestra de materia fecal se diluye 1/5000. De esta manera, la determinación de ETEC F4 se puede realizar utilizando el método de adiciones estándar.

Por otra parte, se desarrolló un magneto-inmunosensor electroquímico que permitió detectar selectivamente a la bacteria ETEC F4 en muestras de materia fecal porcina. El principio de detección se basó en la enzima intracelular  $\beta$ -gal, por lo cual se detectan sólo células vivas. Además, no requiere de la utilización de un anticuerpo secundario marcado lo cual concede ventajas adicionales al procedimiento con respecto a otros inmunosensores.

La hidrólisis del sustrato p-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, catalizada por la  $\beta$ -gal, generó como producto electroactivo el p-aminofenol y su oxidación se detectó por voltamperometría de onda cuadrada.

A fin de mejorar la sensibilidad de la técnica, las suspensiones de bacterias fueron pretratadas con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido, el cual estimula la producción de la enzima, y permeabilizadas con sulfato B de polimixina, para favorecer el contacto entre la enzima y el sustrato.

Luego de optimizar las variables que afectan al principio de detección y el diseño del inmunosensor, se realizó la detección en el sobrenadante de muestras de materia fecal. El procedimiento de preparación fue muy simple y consistió en una dilución en solución amortiguadora de fosfatos y un centrifugado leve.

La concentración de ETEC F4 que se detectó utilizando el magneto-inmunosensor electroquímico fue muy similar a la encontrada mediante la técnica convencional de cultivo y recuento en placas. Esto demuestra que este diseño de inmunosensores en combinación con la técnica voltamperometría de onda cuadrada es una propuesta innovadora que permite la detección de microorganismos patógenos en muestras complejas, constituyendo una metodología rápida y sensible debido a las ventajas propias de la técnica.

Es de destacar que el comportamiento electroquímico de suspensiones de ETEC F4, los sensores electroquímicos desarrollados durante esta tesis doctoral y la aplicación de voltamperometría de onda cuadrada para la detección de bacterias en muestras de materia fecal porcina son, según nuestro conocimiento, los primeros en ser informados.